N° D'ORDRE :
20

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Simone DOMERCQ

1re THÈSE

ÉTUDE ET CLASSIFICATION DES LEVURES DE VIN DE LA GIRONDE

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 15 Juin 1956, *devant la Commission d'Examen :*

MM. GENEVOIS — *Président.*
ALLARD
RIBEREAU-GAYON } *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547307_0019

N° D'ORDRE :
20

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Simone DOMERCQ

1re THÈSE

ÉTUDE ET CLASSIFICATION DES LEVURES DE VIN DE LA GIRONDE

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Soutenues le 15 Juin 1956, *devant la Commission d'Examen :*

MM. GENEVOIS — *Président.*
ALLARD
RIBEREAU-GAYON } *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

Monsieur L. GENEVOIS

Professeur de Chimie biologique à la Faculté des Sciences de Bordeaux

s'est intéressé à notre travail et nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse.

Nous l'assurons de notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur J. RIBEREAU-GAYON

Professeur d'Œnologie et Chimie agricole à la Faculté des Sciences de Bordeaux
Directeur de la Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux

a par son enseignement, suscité en nous l'intérêt pour la Chimie biologique. Il nous a donné le goût de la recherche et a veillé sur notre travail, nous accordant toutes facilités pour le poursuivre dans les meilleures conditions.

Nous le prions de trouver ici un modeste témoignage de notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur E. PEYNAUD

Ingénieur-Docteur chargé de Recherches à la Station Agronomique
et Œnologique de Bordeaux

nous a dirigée tout au long de ce travail. Il nous a apporté par ses conseils et ses critiques une aide bienveillante qui nous a été un précieux encouragement.

Nous tenons à lui exprimer notre profonde et sincère gratitude.

ÉTUDE ET CLASSIFICATION DES LEVURES DE VIN DE LA GIRONDE

PAR

Mlle Simone DOMERCQ

INTRODUCTION

Parmi les industries de la fermentation, la vinification et la brasserie ont été souvent comparées, puisque toutes deux conduisent à des boissons alcoolisées. Cependant, ces deux industries diffèrent considérablement et les acquisitions faites pour l'une profitent peu à l'autre. La brasserie, en effet, travaille sur une matière première disponible en tout temps et dont la composition est à peu près constante. Au contraire, le raisin mûr, matière première de la vinification, n'existe que deux ou trois semaines en automne, ce qui impose un rythme saisonnier à cette industrie. De plus, la composition du moût varie selon les années, les cépages et les régions. On ne peut absolument pas la modifier puisque le moût doit rester un produit naturel pour que le vin conserve sa définition.

Enfin, contrairement au moût de bière qui subit une stérilisation avant d'être ensemencé avec des cultures de levures pures soigneusement sélectionnées, le moût de raisin fermente spontanément sous l'action d'une microflore variée et peu connue, sur laquelle on ne peut guère agir.

Il n'est pas certain d'ailleurs qu'il y ait intérêt à modifier complètement la microflore naturelle des raisins : elle est le résultat d'adaptation à divers facteurs qui ont abouti à un équilibre écologique que l'homme ne peut pas transformer facilement. Cette microflore spontanée a du reste produit jusqu'à ce jour des vins dont les qualités se sont fait reconnaître au cours des siècles. C'est peut-être pour ces raisons qu'acceptant la fermentation telle qu'elle se produit naturellement, les œnologues ont plutôt cherché, semble-t-il, à conserver les qualités des vins et se sont consacrés aux problèmes de stabilisation, de vieillissement. La nécessité de la connaissance de la composition du vin a amené à considérer le point de vue chimique de la fermentation. Les travaux de L. Genevois (46) font date dans ce domaine : ils établissent le bilan de la fermentation et l'utilisent pour une première classification des levures. Mais d'une façon générale le

problème microbiologique de la fermentation a été peu étudié et pratiquement, la fermentation du raisin est à peine dirigée.

Pour les mêmes raisons, un autre problème se pose en Gironde, celui de la conservation des vins liquoreux. Ces vins nécessitent l'emploi de l'anhydride sulfureux, ce qui au-dessus d'une certaine dose, nuit à leur dégustation. Avant de rechercher divers procédés de conservation, il semble que le véritable problème soit celui de l'étude des levures qui se maintiennent actives longtemps dans les vins et provoquent leur refermentation.

Une meilleure connaissance des levures que l'on trouve sur les raisins et qui font le vin, s'impose donc. C'est dans cette intention que nous avons entrepris ce travail qui s'est poursuivi pendant cinq années. Nous avons étudié tout d'abord les levures de raisins prélevés à la propriété dans les régions d'appellation contrôlée du Bordelais, puis les levures qui provoquent les refermentations des vins liquoreux.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Au cours de ses travaux, PASTEUR a montré que la fermentation alcoolique est due à l'activité des levures, petits organismes plus ou moins arrondis ou elliptiques, que l'on trouve en abondance dans le dépôt des liquides en fermentation. Depuis lors, de nombreux chercheurs de divers pays ont étudié les levures et il existe une volumineuse bibliographie sur ce sujet.

A l'origine de ces travaux, se trouvent les méthodes de culture pure qui ont permis d'obtenir des espèces définies et distinctes. En 1881, HANSEN, par dilutions successives en milieu liquide, aboutit à l'isolement d'une cellule unique.

KOCH, en 1883, utilise la méthode des milieux solides : il disperse les cellules dans un milieu liquide qu'il fixe par solidification. Il obtient ainsi des colonies d'origine monocellulaire, qu'il est facile d'isoler. Peu à peu, ces méthodes sont améliorées ou complétées : en 1886, HANSEN opère comme KOCH mais sans lamelle, sous le microscope. LINDNER en 1883 réalise la culture en goutte pendante et en 1893 il met au point la technique des colonies géantes, créant ainsi un nouveau moyen de différenciation des levures.

Ces méthodes ont conduit à la découverte d'un grand nombre d'espèces dont la multiplicité et la variété justifiaient un essai de classification. Pour cela, il était nécessaire de connaître et de rechercher les caractères particuliers de chaque espèce. La taxinomie des levures a donné lieu à une série de travaux très importants.

Etudes taxinomiques générales.

Parmi les premières, citons celle de GUILLIERMOND en 1928 (49), qui donne une description des méthodes employées et une classification des levures.

Puis viennent les travaux plus détaillés de STELLING-DEKKER, en 1931 (107), sur les levures sporogènes, de LODDER en 1934 (60), et de DIDDENS et LODDER en 1942 (36), sur les levures asporogènes.

En 1936, GLAUBITZ et LANEAU (47) réalisent un atlas des organismes de fermentation comprenant une description morphologique et

physiologique des levures. Ciferri et Verona donnent en 1948 (33) une clé analytique des levures du raisin, du moût et du vin.

Tous les travaux de description, d'identification et de classification réalisés dans le monde entier, par des méthodes codifiées, aboutissent en 1952 à l'ouvrage que Lodder et K-Van Rij publient à la suite de leurs études sur la collection des levures du « Centraalbureau voor Schimmelcultures » (C. B. S.) de Delft (61). Cette Taxinomie des levures remise à jour en 1954 (62), est maintenant la base de toutes les recherches sur ces organismes.

Avec un but différent, Mrak et Phaff font en 1948 (72) une étude très complète des levures isolées sur les substrats les plus divers. Ces auteurs considèrent la phylogénie, la génétique, les méthodes d'étude, la taxinomie et l'écologie des levures et citent une volumineuse bibliographie. En 1951, Wickerham (124) publie également un important travail de taxinomie des levures. Il décrit les méthodes employées pour les identifier et les classer, il codifie en particulier la composition des milieux spéciaux d'études afin que les descriptions et les tests soient comparables. Il accorde plus d'importance aux caractères physiologiques, beaucoup moins variables que les caractères morphologiques. A la suite de cette étude générale, il donne une classification du genre *Hansenula* selon les méthodes qu'il a décrites dans la première partie.

Dans le même ordre d'idées, on peut citer le travail de Kirsop en 1954 (54) sur la « National Collection » des levures d'Angleterre ; cet auteur décrit les procédés de classification, de contrôle, de conservation employés à la « Brewing Industrial Research Foundation » et discute la valeur des tests utilisés, soit pour la classification soit pour le contrôle.

En 1954, paraît également un ouvrage de A. Lund sur l'Ecologie des levures (63). Il cherche notamment à établir le cycle de vie des levures au cours de l'année, et décrit les espèces isolées et identifiées. Toutefois il s'agit des levures existant dans la nature dont certaines ne sont pas capables de provoquer la fermentation.

Levures de vin.

Après les travaux de Pasteur sur l'importance des cultures pures en brasserie (78), on a songé à appliquer les mêmes méthodes à la vinification : les accidents de fermentation que l'on déplorait trop souvent justifiaient cette application. Peu à peu, à la suite des travaux d'un grand nombre de chercheurs, on a conseillé l'emploi des levains d'espèces sélectionnées, mais les résultats obtenus n'ont pas toujours été satisfaisants : c'est que la vinification se pratique dans des conditions très différentes de celles de la brasserie : pour avoir une fermentation pure du raisin, il ne s'agit pas seulement d'empêcher la contamination par des espèces

nuisibles à la qualité et à la conservation du produit final, mais il faut aussi arrêter le développement des germes naturels du raisin, afin que les espèces sélectionnées produisent réellement la fermentation.

Dès 1884, divers procédés étaient préconisés : pasteurisation, sulfitage, mais il fallait éviter les modifications de goût qu'ils produisaient sur le moût. C'est pourquoi ROMMIER (88) conseillait d'ensemencer avec un levain suffisamment actif, assez tôt pour que les levures sélectionnées prennent possession du milieu avant que les levures sauvages et autres microorganismes aient commencé à se développer. En 1899, ROY-CHEVRIER (95) et ROSENSTHIEL (89) essaient de mettre au point une méthode de stérilisation par chauffage qui n'altère pas le goût, ne soit pas trop onéreuse et soit efficace.

Cependant, certains cherchent à savoir si toutes les levures sauvages sont à rejeter. En 1894, MULLER-THURGAU (73) compare les résultats de fermentations conduites par des levures apiculées seules, par des levures elliptiques seules, et par un mélange des deux espèces. Il conclut que les levures apiculées sont nuisibles car elles donnent peu d'alcool et beaucoup d'acidité volatile et de produits secondaires. En 1909, MARTINAND (67) étudie la microflore des moûts en fermentation et compare les résultats obtenus par une fermentation dirigée avec des levures elliptiques seules et par une fermentation naturelle avec la succession habituelle des levures apiculées et elliptiques ; il conclut à l'intérêt d'un levurage.

Levures sélectionnées.

On s'intéresse aux caractères organoleptiques transmis au vin par les différentes espèces de levures : on entrevoit même la possibilité de donner le bouquet d'un vin fin à un vin commun grâce aux levures fermentatives (PASTEUR, puis ROMMIER), mais ce résultat ne devait jamais être atteint. ROSENSTHIEL montre le rapport, d'une part, entre la nature du bouquet et le cépage et, d'autre part, entre l'intensité du bouquet et la levure, ce qu'à la même époque la théorie d'EHRLICH permet d'expliquer en montrant que les substances constitutives du bouquet sont issues des acides aminés fermentés par la levure. D'une façon générale, les résultats obtenus par levurage sont assez peu concluants car ils sont variables, et dans les cas où l'addition de levures sélectionnées a montré un avantage dans la production de l'alcool, il n'y a pas forcément amélioration de la qualité du vin ; on obtient en outre une uniformisation du bouquet qui ne convient nullement aux vins fins et n'est profitable qu'aux vins de consommation courante ou de qualité moyenne.

Cependant, cette question, par sa complexité, a continué à intéresser les chercheurs : MUSSO en 1914 puis en 1932 (74, 75), VENTRE en 1934 (112), MOREAU et VINET en 1935 (68), MARTEAU et GALZY en 1954 (66),

en France ; Castelli en 1942 (19) et 1948 (22, 23), Rotini en 1952 (94), Verona en 1952 (117), Cantarelli en 1953 (11), en Italie ; Marques-Gomes au Portugal en 1949 (65), Steinberg (105), puis Gallay, Benvegnin et Capt (41) en 1952 en Suisse ; Schulle en Allemagne (100, 101, 102) et Saller en Autriche (96), Rankine en Australie (84) ont étudié l'influence des levures sélectionnées, ou des associations de levures simultanées ou échelonnées, sur la qualité des vins obtenus. Pour certains, les meilleurs résultats sont obtenus en employant les cultures pures isolées des meilleurs crus d'une région, sur les moûts de cette même région. Mais, d'autres chercheurs engagent à ne pas attendre de la pratique du levurage plus qu'elle ne peut donner ; elle aboutit à une plus grande sécurité, mais non à une amélioration appréciable du bouquet et du caractère des vins. En résumé, la question n'est pas encore résolue et en fait, l'emploi des cultures pures ne s'est pas généralisé.

Travaux sur les levures des régions viticoles françaises

En réalité, il faut connaître suffisamment bien les levures de chaque région pour pouvoir les utiliser au mieux. En France, cette étude n'avait été faite que pour quelques régions, et à un moment où les techniques d'identification et de classification n'étaient pas assez précises pour que les organismes trouvés soient parfaitement déterminés. Néanmoins ces travaux ont été entrepris dans le même but que celui que nous avons poursuivi, c'est pourquoi nous les avons particulièrement étudiés.

En 1904, Descoffre (35) s'intéresse aux levures des Charentes, recueillies sur toutes les parties de la vigne, au cours d'une année entière. Il étudie aussi la succession des levures au cours de la fermentation (Torulas, apiculées, elliptiques). Il reconnaît l'action des agents extérieurs sur les organismes : agitation, lumière, influence du gaz carbonique ; il signale la différence entre les bouquets produits par les diverses levures qu'il a isolées. A la suite de ces observations, il conseille d'employer pour le levurage, « la collection complète des levures charentaises, simplement débarrassées des bactéries et des mycodermes ».

Beaucoup plus tard, en 1941, paraît la thèse de Jean Renaud, élève de Guilliermond, sur les levures des vins du Val de Loire (86). Dans la première partie de ce travail il décrit les méthodes de prélèvement, d'isolement et d'identification, puis les levures qu'il a isolées. Toutefois il n'y reconnaît pas plus de trois types simplement classés d'après la forme des cellules (cerevisiae, ellipsoïdeus, pastorianus) et ne peut donner le nom des espèces qu'il a obtenues, qui sont sans doute *Saccharomyces ellipsoïdeus* et *Saccharomyces oviformis*. Dans la deuxième partie, il étudie la biologie des levures de vin, surtout la sporulation et les phénomènes de sexualité des levures, mais il développe beaucoup

moins leurs caractères biochimiques et leur rôle en vinification. RENAUD croit aussi à l'inutilité du levurage pour les vins de crus dont toute modification de bouquet est une perte de qualité. Ces travaux, d'inspiration un peu ancienne, sont repris dans une « Biologie du Vin » (87).

On peut encore citer quelques travaux moins importants : CORDIER (34) en 1906 fait quelques observations sur les levures de vins blancs qu'il trouve beaucoup plus nombreuses dans le midi de la France que dans le nord ou dans les régions parisienne et champenoise. MARTINAND (67) avait mesuré le nombre et la répartition des levures elliptiques et apiculées, mycodermes et moisissures trouvés sur les raisins au début et à la fin des vendanges : les levures elliptiques sont rares, parfois moins de 1 p. 100 du total des germes. BIDAN et ANDRÉ (7) ont fait une étude récente des vins jaunes du Jura : leur vinification très spéciale tient à la microflore constituée de *Saccharomyces, d'Hansenula*, de *Candida mycoderma*, levures oxydatives formant des voiles.

Signalons encore un récent travail de GALZY et RIOUX (44) sur les espèces de levures se développant en surface des vins du Midi au cours de leur conservation. D'autre part GALZY a donné une intéressante mise au point sur la position des levures de vin dans la systématique (43).

Travaux sur les levures d'Afrique du Nord.

Il existe aussi des travaux sur les levures d'Afrique du Nord réalisés en Algérie par MUSSO dans sa thèse en 1914 (74) et en Tunisie par BERAUD en 1937 (5). Le premier a isolé après plusieurs sélections un petit nombre de levures. Il n'a retenu que celles qui lui paraissaient les plus intéressantes après des tests appropriés. Ce travail a un but pratique, nouveau par rapport aux recherches menées jusque-là : MUSSO soumet les levures isolées à des essais de fermentation à 35° et 38°, très justifiés en Algérie, et en présence de quantités croissantes d'acidité. Il étudie leur résistance à l'alcool et détermine les produits de la fermentation. Il en déduit divers rapports qui lui servent à caractériser les levures isolées. Il étudie la nature de l'acidité volatile formée, la nature des sucres susceptibles d'être fermentés, l'aspect des colonies géantes, la sporulation, puis il les classe d'après la clé de Guilliermond. Il conclut que les levures algériennes ont une résistance et une activité beaucoup plus grandes que celles des régions moins chaudes.

BERAUD a isolé de lies de vin et de raisins au moment des vendanges en Tunisie, des levures elliptiques. Il a retenu les plus actives et a comparé leurs courbes de fermentation, et l'acidité qu'elles produisent sur l'eau de malt saccharosée.

Travaux sur les levures étrangères.

Divers travaux semblables ont été conduits en divers pays. C'est ainsi que NITESCU dans une thèse soutenue à Paris en 1914 (77) rend compte de ses recherches sur les levures roumaines : après une importante bibliographie, il décrit ses méthodes de prélèvement, d'isolement et d'identification par examens morphologiques et culturaux et par tests physiologiques : sucres fermentés, liquéfaction de la gélatine, influence de l'acidité et de l'alcalinité sur la marche de la fermentation, consommation du sucre, bilan de la fermentation, etc. Il a trouvé ainsi 11 variétés de levures elliptiques.

En 1939, ZIMMERMANN (128) a publié une étude sur l'identification des ferments trouvés en Allemagne dans les vins malades ou troubles ; trois espèces de *Saccharomyces* sont représentées, *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. carlsbergensis* variété *valdensis*, *Sacch. uvarum*. L'auteur cherchait surtout à élaborer des méthodes pour la détermination des variétés nouvelles.

En 1950, KRIMBAS et DAVIDES (55) étudient la microflore des principaux cépages de cuves helléniques avec un but pratique : en plus des caractères morphologiques et physiologiques courants, ils recherchent les aptitudes particulières des levures isolées : fermentation des divers sucres, assimilation des matières azotées, production d'alcool, résistance à l'alcool et à l'anhydride sulfureux. De plus ces auteurs ont conduit au laboratoire des fermentations expérimentales sur les divers cépages avec des volumes assez importants pour comparer leurs résultats avec ceux de la pratique courante, mais la microflore qu'ils ont isolée paraît assez spéciale, car sur 147 microorganismes ils ne décrivent que 15 *Saccharomyces*.

En 1950 également, SOOS et ASVANY (104) ont fait des recherches sur les levures hongroises. Le travail est important puisqu'ils ont isolé 1291 souches de levures qui ont donné 75 cultures pures. Ce sont surtout des *Sacch. ellipsoïdeus*, quelques *Sacch. oviformis* et un certain nombre de levures non identifiées. Mais de nombreux tests pratiques ont été effectués : fermentation des sucres, tolérance au sucre, résistance au froid, à la chaleur, production du bouquet.

La thèse de STEINBERG (loc. cit. 106) sur les levures de vins « flétris » du domaine de Diolly constitue un travail du même genre. Ces vins sont obtenus par une pratique spéciale, la cueillette des raisins étant beaucoup plus tardive que dans les autres régions de Suisse. Les microorganismes sont différents : STEINBERG a trouvé des *Saccharomyces*, des *Torulopsis*, des *Pichia*, et des *Hansenula*. Après l'exposé de ses méthodes, il propose pour ces levures un nouveau système de clés analytiques.

Sans aborder les nombreuses études des levures du type Xérès on

relève, parmi les travaux de langue anglaise, celui de Mrak et Mac Clung en 1940 (71) sur les levures trouvées en Californie sur les produits de la vigne : raisins frais, marc, feuilles, sols, moûts et vins nouveaux, vins troubles en bouteilles. Ces auteurs ont isolé 241 espèces, dont 128 sur les raisins frais se répartissant en 134 *Saccharomyces*, 11 *Hansenia-spora*, 8 *Pichia*, 1 *Debaryomyces*, 6 *Rhodotorula*, 54 *Candida*, 1 *Lipomyces*.

En 1951, paraît le travail de Scheffer et Mrak (99) sur les levures provoquant des troubles dans des vins blancs secs. Sur les 18 échantillons de vins de Californie en leur possession, ils reconnaissent 14 espèces : 11 *Saccharomyces*, 2 *Pichia*, 1 *Candida*. De plus, ils les soumettent à une série de tests d'importance pratique en œnologie : développement sur le vin, température optimum, tolérance à l'alcool, tolérance à l'anhydride sulfureux, production d'alcool, production d'acidité totale et volatile. Ce travail comporte donc une orientation spéciale vers l'intérêt pratique.

Au cours de travaux qui ont porté sur un grand nombre d'échantillons prélevés dans la région vinicole la plus étendue et la plus renommée du Japon, I. Yokotsuka et ses collaborateurs (126) ont isolé de vins et de moûts en fermentation un très grand nombre d'espèces de levures, dont la répartition et la fréquence, en particulier pour les *Saccharomyces*, sont assez semblables à ce qu'on observe en Europe. Ils ont identifié *Sacch. ellipsoïdeus*, *Sacch. oviformis*, *Sacch. bayanus*, *Sacch. heterogenicus*, *Sacch. acidifaciens*, *Sacch. steineri*, *Sacch. fermentati*, *Sacch. rouxii*, *Torulaspora rosei*, etc. Ces travaux, de même que ceux conduits en Californie, montrent qu'on retrouve dans le monde entier, dans la fermentation vinaire, à peu près le même équilibre écologique entre les espèces de *Saccharomyces*. Ces mêmes auteurs ont étudié les levures produisant des voiles sur les vins japonais (127).

Travaux sur les levures italiennes.

Il faut citer à part les travaux conduits dans les diverses universités et stations viticoles d'Italie. Ces études forment un ensemble de recherches systématiques, conduites région par région dans l'Italie entière : de Pavie, de Pérouse, de Pise, de Milan, de Turin, de Naples, des équipes de chercheurs sont parties pour prospecter la péninsule italienne, la Sicile et la Sardaigne.

Tous ces travaux fournissent une documentation très complète et certainement unique sur l'action des facteurs climatiques sur la microflore levurienne des raisins. A cause de sa forme étirée entre le 37^{e} et le 47^{e} parallèles, l'Italie permet d'apprécier l'influence de la latitude, traduite par le climat. A cause de son relief comportant une chaîne côtière, qui étage la culture de la vigne entre le niveau de la mer et une altitude de

700 mètres, les microclimats échelonnés en latitude sont reproduits en hauteur.

Ces études ont été commencées en 1933 par de Rossi dans la région de l'Ombrie (92) où 87 moûts ont donné 379 cultures pures dont 164 *Sacch. ellipsoïdeus*, 142 *K. apiculata*, 32 *K. magna*, 21 *Torulaspora rosei*.

En 1935, Casale et Mensio (15) étudient les ferments des régions septentrionales de l'Italie ; ils y trouvent la prédominance des levures apiculées en début de fermentation, puis peu à peu, les levures elliptiques prennent possession du milieu.

A partir de 1939, Castelli et ses collaborateurs commencent à prospecter les diverses régions d'Italie : Chianti et zone limitrophe en 1939 (16), les Pouilles en 1948 (20), la Calabre avec Capriotti, en 1952 (12), la province de Trévise par Capriotti et Cantarelli en 1952 (14), la Sicile occidentale en 1950 (24), et en 1953 avec Del Giudice (31), la Vénétie en 1953 avec Capriotti (13), la région de l'Etna en 1955 par Castelli et Del Giudice (32).

En même temps, Verona et ses collaborateurs étudiaient d'autres régions : en 1949, la Toscane (38), en 1951 la Sardaigne (115). D'autre part, Malan, en 1951 prospectait le Piémont (64).

Les travaux des chercheurs italiens précisent le nombre de souches obtenues, la répartition des différentes espèces, la fréquence de ces espèces dans les moûts prélevés, les propriétés morphologiques et physiologiques de ces levures.

Les espèces les plus courantes sont *K. apiculata* et *Sacch. ellipsoïdeus* : on les trouve dans presque tous les moûts. Ce sont elles qui sont en général responsables de la fermentation vinaire. Un second groupe d'espèces est formé par *Sacch. bayanus, uvarum, italicus, mangini*, par *Torulaspora rosei, Candida pulcherrima* et *K. magna*. Ces espèces plus rares, ne sont pas représentées dans tous les moûts, mais sont cependant assez courantes pour que l'on puisse croire à leur participation effective à la fermentation. Enfin, un troisième groupe est formé de levures dont la présence est accidentelle.

De ces travaux, résumés à plusieurs reprises par Castelli en 1948 (21), en 1952 (26, 27) et en 1954 (29, 30), il résulte que le climat a une influence déterminante sur la répartition des espèces ; elle subit des variations importantes du nord au sud de l'Italie. Dans les régions septentrionales, les espèces sont en majorité asporogènes, les *K. apiculata* sont très nombreuses, plus que les Saccharomyces. Dans l'Italie centrale les proportions sont à peu près égales. Mais dans les régions méridionales ce sont les espèces sporogènes qui dominent et les *K. apiculata* sont peu à peu remplacées par les *Hanseniaspora*, levures apiculées formant des spores.

D'une façon générale, les degrés alcooliques obtenus sont plus élevés

au sud que dans le nord, et ceci est vrai à la fois pour les levures apiculées et pour les levures elliptiques. Les chercheurs italiens présentent des graphiques très significatifs à ce sujet.

Ces volumineux travaux amènent à penser qu'il y a une adaptation de la microflore levurienne au climat, et en particulier à la température : en effet dans les régions où une chaîne de montagnes longe la côte, on retrouve à une altitude plus élevée les mêmes caractères dans la répartition des espèces que dans des régions de plaine situées plus au nord. La richesse des moûts en sucre, plus forte dans les régions chaudes, participe certainement à l'adaptation.

D'autre part, les propriétés physiologiques des différentes levures isolées ont montré aux chercheurs italiens que l'homme peut intervenir parfois avec intérêt dans le choix des organismes de fermentation. *T. rosei*, par exemple, doué d'un pouvoir alcoogène moyen, produit une très faible acidité volatile et a été utilisé dans certaines caves italiennes de vins de consommation courante (11). La résistance à l'anhydride sulfureux a aussi conduit les auteurs italiens à la recherche de races adaptées à des taux élevés de cet antiseptique, mais ce caractère ne semble pas acquis définitivement (113). Scardovi (97) s'intéresse aussi à ce problème et à celui de l'hybridation en vue d'améliorer par voie génétique les qualités industrielles des levures. J. Rossi (93) étudie la floculation de 63 levures de vin, qualité recherchée pour obtenir la clarification spontanée des vins.

Ces travaux forment un ensemble du plus haut intérêt par l'abondante documentation qu'ils fournissent sur un pays où la culture de la vigne est très répandue et dont une partie est à la même latitude que le nôtre ; on peut affirmer qu'ils ont fait école dans le monde.

Travaux sur diverses espèces.

Les travaux d'écologie sur la répartition des levures dans la nature, en particulier sur les fleurs et les fruits, sont très nombreux et nous n'en ferons pas état, bien qu'ils puissent donner souvent des résultats analogues à ceux obtenus pour la vigne et le raisin. Nous avons déjà cité la monographie de Lund à ce sujet.

Il n'est pas dans notre intention non plus d'entrer dans le détail du nombre considérable de travaux consacrés aux caractères cytologiques, génétiques, physiologiques, enzymatiques, auxologiques des levures et aux divers aspects de leur métabolisme. Nous citerons cependant les études de Suzanne Lafourcade (57) et de Madeleine Lafon (56) qui constituent les deux volets du triptyque consacré à l'étude des levures de vin par le service de recherches de la Station œnologique de Bordeaux.

Un certain nombre d'auteurs se sont attachés à l'étude d'une espèce particulière de levures. Parmi ces travaux nous citerons ceux présentant un intérêt pour la connaissance des levures de vin.

Les levures apiculées ont été le sujet des recherches de HANSEN à partir de 1881 ; de JORGENSEN en 1900 (52), de DE ROSSI en 1920 (91), de NIEHAUS en 1932 (76), de TARANTOLA en 1933 et 1945 (109, 110), d'ANTONIANI en 1947 (2), de VERONA en 1951 (116) de VAN UDEN et ASSIS-LOPEZ en 1953 (111).

Les opinions sur l'utilité des *K. apiculata* sont diverses. Apparemment leur participation n'est pas intéressante, car elles donnent peu d'alcool et forment beaucoup d'acidité volatile. Les *K. apiculata* forment des produits secondaires qui ont une influence certaine sur le bouquet, mais cette influence n'est pas stable et TARANTOLA conseille d'éliminer cette espèce dans la fermentation vinaire par l'anhydride sulfureux. On admet généralement que les levures apiculées n'agissent qu'au début de la fermentation, étant vite paralysées par l'alcool, néanmoins VERONA pense qu'elles peuvent intervenir jusqu'à la fin de la fermentation.

L'espèce *Brettanomyces* a donné lieu à plusieurs travaux. Elle a été découverte tout d'abord dans les bières, par CLAUSSEN en 1904, mais KUFFERATH et VAN LAER ont été les premiers à en faire un nouveau genre. VERONA et FLORENZANO (119) l'ont signalée sur les raisins, mais il s'agissait en réalité de *T. bacillaris*. SCHANDERL et DRACZYNSKI (98) l'ont trouvée dans des vins mousseux allemands et BARRET, BIDAN et ANDRÉ (4) l'ont isolée sur des vins d'Arbois, dans lesquels elle produit des troubles gênants. De même GALZY et RIOUX (44) ont trouvé *Brettanomyces bruxellensis* associé avec la maladie de la « fleur » sur des vins du Midi. Cependant certains auteurs ne croient pas à sa présence sur le raisin et sont persuadés même que ce genre n'est pas valable.

VAN DER WALT (122) a étudié *Candida pulcherrima*, avec son cycle de vie, l'apparition de mutants rouges. VERONA et FLORENZANO lui ont consacré également une publication (121).

Le genre *Hansenula* a été étudié par GRAY en 1949 (48) qui a recherché les conditions de formation de l'acétate d'éthyle et par CANTARELLI, en 1950 (10), qui a comparé trois variétés d'*Hansenula anomala*. Signalons encore les travaux de TABACHNICK et JOSLYN (108).

Enfin, HJORT en 1954 (50) a fait quelques études sur le genre *Saccharomycodes* Hansen.

En résumé, la bibliographie concernant les levures de vin est très abondante, mais nous avons pu constater combien la contribution des œnologues français à cette étude reste faible. Cela est particulièrement visible si on la compare avec les recherches menées en Italie depuis déjà un certain nombre d'années. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris cette étude, en espérant qu'elle contribuera à combler cette lacune.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ISOLEMENT ET DE CLASSIFICATION

Nos travaux ont porté sur les prélèvements de levures effectués aux cours des vendanges 1951, 1952, 1953. Nous avons étudié les deux premières années la région du Médoc et la région de Saint-Emilion ; en 1953, les prélèvements, beaucoup plus importants, ont été faits dans des régions de la Gironde plus diverses, produisant soit des vins rouges, soit des vins blancs : Libournais, Entre-deux-Mers, Premières Côtes de Bordeaux, Graves, Sainte-Croix-du-Mont, Barsac, Sauternes, Sainte-Foy-la-Grande et Monbazillac en Dordogne. Chaque fois qu'il a été possible, nous avons fait des prélèvements deux années de suite dans la même région, ou dans la même propriété, afin de vérifier si la microflore était constante. La carte reproduite dans ce travail, indique les régions prospectées à l'exception de Sainte-Foy-la Grande et Monbazillac situé en Dordogne.

Enfin, nous avons pu étudier un certain nombre de vins blancs et rouges subissant, au cours de leur conservation, une refermentation soit en fûts, soit en bouteilles. Ils provenaient de chais de producteurs ou de négociants.

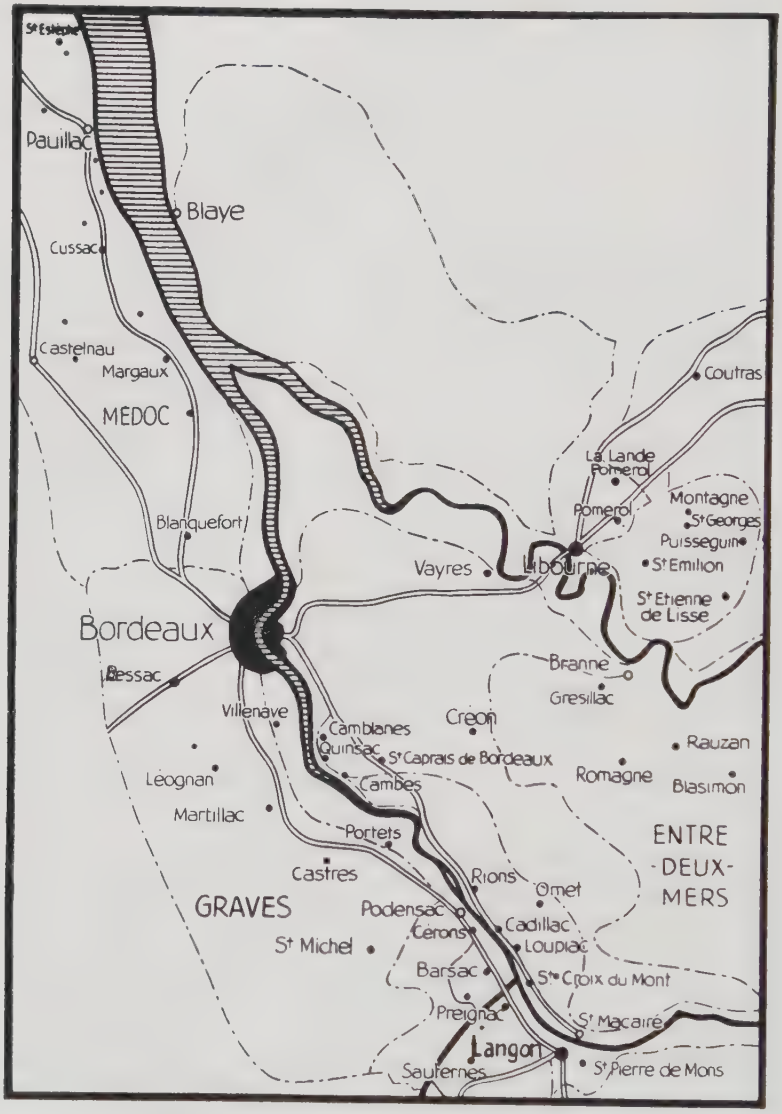
Pour le prélèvement des échantillons au moment des vendanges, nous nous sommes inspirés des travaux italiens qui ont comporté une étude systématique de chaque région d'Italie.

Pour l'étude des levures, nous avons suivi les méthodes employées par STELLING-DEKKER et LODDER. La parution de l'ouvrage de LODDER et K-VAN RIJ en 1952 (61) nous a été d'un grand secours et c'est en nous basant sur les classifications et les descriptions qu'il propose que nous avons pu identifier les organismes isolés. Nous avons eu également recours, dans les cas difficiles, aux avis autorisés du Prof. CASTELLI de Pérouse et de M^lle^ SLOOF de Delft, et nous tenons à les en remercier très vivement.

I. — TECHNIQUE DES PRÉLÈVEMENTS

En 1951, nous avons prélevé avec des ciseaux stérilisés, environ 1 kg de grappes de raisins sains, dans chaque propriété étudiée, au centre des pièces de vignes, à l'écart des chemins ; nous les avons recueillis dans des poches de toile, enveloppées de feuilles de papier filtre et stérilisées

en autoclave. Le lendemain de la récolte, au laboratoire, les raisins étaient pressés entre les mains lavées au préalable à l'alcool, à travers la poche de toile, dans un mortier de porcelaine lavé à l'alcool et flambé. On



recueillait ainsi 500 à 600 cm³ de jus qui était mis à fermenter à 25°C en bouteilles de 750 cm³ stérilisées.

Ce système de prélèvement nous donnait surtout des levures apiculées et conduisait à une répartition des levures fort différente de celle des levures de fermentation dans la pratique. Nous avons donc modifié par la suite la technique de nos prélèvements.

Nous avons alors recueilli du moût non sulfité des cuves récemment chargées, ou de la vendange simplement foulée et égrappée. Parfois nos prélèvements portèrent sur du moût déjà en fermentation. Ce liquide était recueilli dans des bouteilles stériles de 750 cm^3.

Le jour même ou, au plus tard le lendemain, nous commencions au laboratoire les opérations en vue de l'isolement des espèces contenues dans ces liquides.

II. — TECHNIQUE DES ISOLEMENTS

Le liquide obtenu par le pressurage des raisins à la main ou le moût recueilli à la propriété, était homogénéisé. A l'aide d'une anse de platine flambée, on ensemençait un tube contenant 10 cm^3 de moût de raisin stérile. Après agitation par rotation entre les paumes des deux mains, ce tube servait à une nouvelle dilution effectuée de la même façon dans un deuxième tube qui servait lui-même pour un troisième. Le contenu de ces trois tubes, versé dans trois boîtes de Pétri stérilisées et mélangé avec de la gélatine à 20 p. 100 fondue fournissait trois dilutions successives des organismes présents dans le jus de raisins.

Au bout de quelques jours de conservation des boîtes de Pétri à la température du laboratoire, des colonies apparaissent à la surface de la gélatine nutritive ou en profondeur. Avec un fil de platine flambé, on prélevait successivement un certain nombre de colonies, six en général, et les introduisait chacune dans un tube de moût stérile. On notait les caractères de la colonie choisie : en relief, en creux, brillante, mate, prise à la surface ou en profondeur, liquéfiant ou ne liquéfiant pas la gélatine.

Par ailleurs, les flacons de 750 cm^3 avaient été mis à fermenter à l'étuve à 25°C et des prélèvements semblables étaient faits plusieurs fois, à divers intervalles de temps, suivis d'isolement en milieu solide, selon la même méthode.

Un dernier prélèvement fut fait bien après la fin de la fermentation (au bout de deux mois). L'ensemencement direct des boîtes de Pétri n'étant pas possible dans ces conditions, une culture de rajeunissement fut d'abord préparée. Seule la deuxième dilution fut utilisable, car le nombre de colonies était beaucoup plus élevé qu'au premier prélèvement.

En 1952, les isolements ont été conduits plus rationnellement dès le début : les boîtes de Pétri ont été ensemencées le jour même du pressurage à la main des raisins, puis le dixième jour et le trentième jour, avec deux dilutions seulement. De plus, dans la plupart des propriétés un prélèvement à la cuve ayant été fait en même temps, il servit à préparer une autre boîte de Pétri avec la deuxième dilution de ce liquide, le lendemain du prélèvement. Dans chaque boîte de Pétri, 6 colonies ont été choisies.

En 1953, il n'a été prélevé que des liquides, soit dans les cuves pour les raisins rouges, soit à la sortie des presses pour les raisins blancs, soit dans les fûts de fermentation, en particulier à Sauternes. Afin de différencier au maximum les espèces présentes dans ces jus tout prêts à fermenter, nous avons partagé les 600 cm^3 de liquide recueilli entre quatre flacons stériles ; l'un d'eux, servant de témoin, n'a reçu aucune addition tandis que les trois autres ont reçu respectivement 6,5 cm^3 d'alcool à 95° ,ce qui portait le milieu à 4° d'alcool, 10 mg/l d'actidione et enfin 4° d'alcool + 10 mg/l d'actidione. De cette façon, nous avons éliminé la plupart des Saccharomyces par addition d'actidione. Nous avons pensé obtenir ainsi des espèces plus rares.

Trois prélèvements, avec deux dilutions et ensemencements en boîtes de Pétri, ont été faits sur les témoins le premier jour, le vingtième jour et au bout de deux mois après rajeunissement sur moût stérile. Les flacons qui avaient subi les additions ont été tenus à l'étuve à 25° ; mais l'actidione et le mélange alcool et actidione ayant empêché le départ de la fermentation par les levures les plus actives, les bactéries ont envahi les milieux correspondants et il a été souvent impossible d'isoler les levures. Les prélèvements ont été faits le plus tôt possible soit 2 à 8 jours après l'addition, et l'ensemencement des boîtes de Pétri a été fait à deux dilutions, mais à un seul moment pour chaque flacon.

Les différences dans le nombre des colonies observées dans les boîtes de Pétri ont attiré notre attention sur la prolifération des levures aux divers moments de la vendange. Par dilutions exactes, et numération en milieu solide, nous avons pu connaître le nombre de levures contenues par mm^3 de jus de raisins cueillis ou prélevés en divers endroits des propriétés. Le détail des résultats a été donné dans une publication précédente (79). En moyenne, on compte 35 levures par mm^3 de jus pour des raisins prélevés aseptiquement à la vigne, 44 levures pour des raisins prélevés à la comporte à leur arrivée au cuvier, et plus de 1 800 levures à la sortie du fouloir-égrappoir.

De ces chiffres il ressort que, même en période de vendanges, il y a relativement peu de levures sur les raisins et qu'elles sont très irrégulièrement réparties. Ainsi s'explique la lenteur des départs en fermentation au laboratoire lorsqu'on prélève aseptiquement des raisins à la vigne. Dès que la vendange est un peu manipulée, ce qui aboutit à l'écrasement des grains de raisins mûrs, les levures deviennent plus nombreuses car le jus qui se répand sert à la fois d'aliment et de véhicule aux levures qui envahissent tout le matériel des vendanges. La fermentation étant conduite par les levures les plus nombreuses, il y a intérêt à faire les prélèvements non pas sur les raisins, mais sur les moûts obtenus après le foulage. C'est ce que nous avons fait en 1952 et 1953.

Il faut reconnaître cependant que les souches isolées ne représentent

qu'une minime partie des souches existantes dans le moût : alors qu'il y a plus d'un million de cellules de levures par cm³ du jus provenant du foulage, nous n'avons pu retenir et étudier que 30 souches au maximum pour chacun d'eux. On n'obtient ainsi que les espèces prédominantes. Pour cette raison, même les levures qui paraissent rares d'après nos chiffres, peuvent avoir une action non négligeable au cours de la fermentation. Il est certain que d'autres espèces existent, qu'au cours de nos essais nous n'avons pas rencontrées. Néanmoins, nous pensons que les prélèvements effectués donnent une idée valable de la microflore qui conduit la fermentation dans la région bordelaise.

III. — ÉTUDE DES LEVURES ISOLÉES

La différenciation et la classification des levures sont surtout basées sur leurs caractères morphologiques et physiologiques. Ces caractères n'ont pas tous la même importance dans la classification ; certains en effet se montrent trop variables suivant les conditions extérieures pour que l'on puisse établir d'après eux un diagnostic certain.

Nous avons utilisé divers milieux de culture au cours de cette étude, ils seront décrits plus loin avec la méthode employée pour le test correspondant. Nous décrirons ici les milieux de culture liquides et solides qui nous ont servi couramment.

a) **Milieu de culture et de conservation.** — C'est du moût de raisin pasteurisé. Suivant les années il n'a pas toujours eu la même composition. La teneur en sucre a varié de 150 à 227 g/l. Le moût pasteurisé est filtré puis réparti, à raison de 10 cm³ par tube, en tubes bouchés d'un tampon d'ouate, stérilisés une heure à 180 °. Les tubes pleins sont stérilisés à l'autoclave en les portant à 120°. Ce milieu étant naturellement acide, il n'y a pas avantage à le chauffer plus longtemps car il perd ses facteurs de croissance et le chauffage oxyde les sucres.

b) **Milieux solides de conservation** — *Malt gélosé* — Nous employons du moût de bière naturel, pasteurisé, dilué à 15° Balling (d = 1,059), neutralisé à pH 7.

On y dissout à 100° la gélose finement coupée à raison de 15 g par litre. On répartit en tubes stériles, stérilise 15 minutes à 120° et laisse refroidir les tubes en position inclinée.

Eau de carotte gélosée — On fait macérer 450 g de carottes râpées dans 3,6 l d'eau, pendant une heure. Après 10 minutes d'ébullition, on filtre sur coton. On ramène le pH à 5 et on solidifie le milieu par 30 g de gélose par litre dissoute comme précédemment ; on répartit en tubes stériles qui après stérilisation pendant 15 minutes à 120° sont mis à refroidir en position inclinée. Sur ce milieu, préconisé par Malan (64), les *Saccharomyces* sporulent très bien et se conservent longtemps.

c) **Température de conservation** — Nous conservons à basse température les cultures de levures non sporogènes en milieu liquide ou en milieu solide. Nous les rajeunissons tous les quatre mois et après quelques jours de développement à 25°, nous les mettons au froid.

Les levures sporogènes sont repiquées tous les deux mois et conservées en milieu liquide et en milieu solide à la température du laboratoire. Pour les *Saccharomyces* le milieu solide choisi est l'eau de carotte gélosée, pour toutes les autres levures, c'est le malt gélosé.

Pour atténuer les variations possibles au cours de la conservation, les repiquages se font à partir de la culture précédente de milieu liquide à milieu solide et inversement.

Les tubes de milieu solide sont capuchonnés de papier filtre afin d'éviter la pénétration des germes de moisissures à travers le tampon d'ouate.

A. — Examen des caractères morphologiques.

Forme et dimensions des cellules — Le milieu liquide choisi est le moût de raisin stérile. Les observations au microscope ont été faites au bout de trois jours, ou de six jours de culture à 25°, avec un grossissement de 900.

Cet examen permet de différencier rapidement les levures apiculées, les *Saccharomycodes*, les *Torulopsis bacillaris*, les espèces rondes ou allongées. Nous avons noté les dimensions des cellules et nous les avons dessinées. Le mode de bourgeonnement a ainsi été noté : polaire, bipolaire, multipolaire.

Cet examen est très important lorsqu'il permet de distinguer des genres. Mais il devient à notre sens beaucoup plus délicat quand il s'agit d'espèces, ce qui est le cas dans la distinction entre *Sacch. exiguus* et *Sacch. chevalieri*, entre *Sacch. fermentati*, *Sacch. oviformis* et *Sacch. bayanus*, et même dans un autre groupe entre *Sacch. florentinus*, *Sacch. carlsbergensis* et *Sacch. uvarum*.

Les descriptions ne suffisent d'ailleurs pas, du fait du manque de précision des termes « ovale », « elliptique », « allongé ». Le nombre de générations successives de levures dans une préparation met en présence des cellules de toutes dimensions que l'on peut retrouver dans toutes les espèces.

Formation des spores — Ce caractère est d'une importance fondamentale puisqu'il permet de placer l'organisme considéré soit parmi les levures sporogènes ou *Saccharomycetaceae*, soit parmi les levures non sporogènes ou *Fungi imperfecti* qui sont les deux grands groupes des champignons.

Mais ce caractère est parfois difficile à mettre en évidence, car il est courant que certaines espèces de *Saccharomycetaceae* perdent leur faculté de sporulation au cours d'une longue conservation.

De plus cette propriété dépend beaucoup des conditions extérieures. La composition du milieu a une grande importance ; il y aurait intérêt à connaître la composition exacte d'un milieu standard pour sporulation. Mais actuellement il existe une grande quantité de milieux proposés pour cette étude, dont beaucoup ne conviennent qu'à une seule espèce.

Nous avons utilisé comme milieux de sporulation le malt gélosé des cultures de conservation, sur lesquelles apparaissent souvent des spores, l'eau de carotte gélosée, et enfin, le milieu classique de GORODKOWA (1) ; l'examen microscopique a été fait au bout d'un mois de culture à la température du laboratoire.

Caractères culturaux — *Caractères de la colonie prélevée sur la gélatine de la boîte de Pétri* : aspect, liquéfaction de la gélatine.

Caractères de la culture sur moût de raisin. — L'observation est faite au bout de trois à six jours et au bout de deux mois : elle porte sur la limpidité qui donne une idée de la faculté de sédimentation de la levure, importante en œnologie. Il peut y avoir formation d'un anneau ou d'un voile, propriété qui se rattache aux caractères physiologiques de la levure puisqu'il y a un rapport entre le besoin d'oxygène et la formation des voiles. Nous avons parfois noté l'aspect de la mousse.

Caractères de la culture sur malt gélosé. — Nous les avons observés au bout de quelques jours et au bout de deux mois de culture. On note la couleur, l'aspect brillant ou mat, lisse ou ridé, la bordure unie, festonnée, ramifiée, ou lobée.

Caractères de la colonie géante sur moût de raisin gélatiné. — Ce test ne peut être fait que pour les levures qui ne liquéfient pas la gélatine. On peut noter au bout de un ou deux mois : la couleur, la forme, l'espect mat ou brillant, le relief, l'épaisseur, l'aspect de la bordure de la colonie.

Toutefois, si certains genres se différencient bien de cette façon : *Torulopsis bacillaris*, il n'en est pas de même pour les diverses espèces de *Saccharomyces*, pour lesquelles on ne peut trouver aucun trait commun distinctif. Parmi les *Saccharomyces* d'une même espèce, on peut trouver toutes les variations et entre plusieurs espèces, observer toutes les transitions. Cependant, nous avons pu noter une certaine parenté entre les levures d'une même origine, résidant dans la coloration, la grosseur, ou la forme générale.

Mais si l'on refait le test on ne trouve pas obligatoirement des résultats identiques. Un grand nombre de facteurs doivent intervenir parmi lesquels la consistance de la gélatine est un des plus importants.

Dans certains cas, nous avons essayé d'obtenir des colonies géantes sur moût de raisin gélosé, et moût de bière gélosé, préparés de la même façon que le moût gélatiné. Les colonies sont tout-à-fait différentes : beaucoup plus épaisses, blanches, informes, que sur moût de raisin gélatiné.

(1) Milieu de GORODKOVA : glucose 0,1 p. 100 ; peptone 1 p. 100 ; NaCl 0,5 p. 100 ; gélose 3 p. 100.

Tous ces caractères ne nous paraissent pas assez fidèles pour avoir une réelle importance dans l'identification et la classification des levures. Ce sont des caractères secondaires pouvant confirmer d'autres résultats plus décisifs. D'ailleurs les termes de description sont subjectifs et trop imprécis, pour qu'on puisse établir une classification uniquement d'après la description des caractères culturaux.

B. — Examen des caractères physiologiques.

Fermentation des différents sucres. — La propriété de faire fermenter divers hydrates de carbone dépend de la richesse enzymatique de la cellule de levure. C'est donc un caractère particulièrement stable, qui est à la base des études d'identification et de classification des levures. Il a été employé par tous les chercheurs.

Nous avons utilisé les tubes de DURHAM que beaucoup d'auteurs (8,61) trouvent plus sensibles que les tubes d'EINHORN. Nos essais de fermentation ont porté sur le maltose, le saccharose, le galactose et le raffinose, et dans quelques cas particuliers seulement, sur le lactose.

Nous avons jugé inutile d'essayer le glucose et le lévulose puisque les cultures ont été faites sur moût de raisin qui contient des quantités à peu près égales de ces deux oses et que nous n'avons retenu que les levures fermentatives. D'ailleurs KLUYVER a énoncé la règle qu'une levure qui fait fermenter le glucose, fait fermenter aussi le fructose et le mannose.

Pour la constitution du milieu, nous avons employé de l'eau de levure, ou de l'extrait de levure, dans lesquels BOUTHILET et ses collaborateurs (8) ont mis en évidence la présence de tréhalose, sucre fermentescible. LODDER et K-VAN RIJ qui emploient ce même milieu, considèrent que le tréhalose ne modifie pas les résultats du test. Nous avons toujours préparé les milieux par grandes quantités, il y a toujours eu des levures qui ne faisaient pas fermenter tel ou tel sucre, ce qui prouve que la présence possible de tréhalose n'a pas fait paraître positifs des résultats négatifs.

Le raffinose est un triholoside formé d'un ose, le fructose, et d'un diholoside, le mélibiose formé lui-même de glucose et de galactose. Certaines levures ne font pas fermenter le raffinose, d'autres capables de l'hydrolyser, le font fermenter. On distingue celles qui ne le font fermenter que partiellement : ce sont celles qui détachent le fructose, soit un tiers de la molécule, mais qui sont sans action sur le mélibiose et celles qui hydrolysent à son tour le mélibiose, mais laissent intact le galactose. Enfin, certaines levures, capables de faire fermenter le galactose, poussent jusqu'au bout la transformation. Or on ne peut dire a priori, en se basant sur le seul dégagement gazeux de quelle manière la levure a dégradé le raffinose.

Divers moyens ont été proposés. LODDER et KREGER-VAN RIJ utilisent l'appareil de VAN ITERSON-KLUYVER, quand la levure est capable

de faire fermenter le saccharose. On peut employer également les méthodes biologiques de WICKERHAM (124) ou de SKINNER et BOUTHILET (103). Le premier, quand le dégagement gazeux produit par la fermentation du raffinose a cessé, ensemence le tube avec *Sacch. carlsbergensis* : si un nouveau dégagement gazeux se produit, signe de la présence de mélibiose, la levure essayée n'avait donc fait fermenter qu'un tiers du raffinose. Si au contraire il n'y a pas de dégagement de CO_2 après l'ensemencement de *Sacch. carlsbergensis* la levure avait fait fermenter le raffinose entièrement.

SKINNER et BOUTHILET opèrent à l'inverse : ils font fermenter une solution de raffinose par *Sacch. ellipsoïdeus* qui y laisse le mélibiose inattaqué. Ils ensemencent cette solution de mélibiose avec la levure essayée. Cela revient à ajouter le mélibiose à la liste des sucres mis à l'essai.

Nous avons employé un autre moyen qui nous a donné de bons résultats ; lorsque le dégagement gazeux visible dans le petit tube de DURHAM prouve qu'il y a eu fermentation, deux cas sont possibles : il reste dans le milieu le mélibiose, sucre réducteur, ou il ne reste plus aucun sucre. Si on essaie le pouvoir du résidu de la fermentation vis-à-vis de la liqueur de FEHLING, il est possible de savoir si le raffinose a été fermenté au tiers ou entièrement. Pour cela il faut attendre que la fermentation soit terminée : nous attendons un mois. Il faut 0,6 cm^3 du résidu de fermentation de 10 cm^3 d'eau de levure sucrée à 2 p. 100 de raffinose, pour faire disparaître la couleur bleue de 1 cm^3 de liqueur de FEHLING à 5 g/l, dans le cas des *Sacch. ellipsoïdeus* et de toutes les levures qui ne font fermenter que le tiers du raffinose.

Pour les autres (*Sacch. florentinus, Sacch. carlsbergensis, Sacch. uvarum*) tout le résidu de fermentation ne peut décolorer 1 cm^3 de liqueur de FEHLING et aucune trace de réduction n'est visible.

Le milieu de base utilisé dans les tests de fermentation a été d'abord de l'eau de levure (200 g de levure SPRINGER par litre), puis un extrait de levure préparé avec 7,5 g/l d'un extrait commercial.

On prépare d'autre part les solutions sucrées à 10 p. 100 du sucre considéré, dans l'eau du robinet. On stérilise en portant à 120°.

Le milieu définitif contient 4/5 d'extrait ou d'eau de levure et 1/5 de solution sucrée ce qui porte la solution définitive à 2 p. 100 en sucre. On répartit dans les tubes contenant une clochette DURHAM renversée stérilisés au préalable. On stérilise à l'autoclave 10 minutes à 110° : l'air des clochettes ayant été chassé à l'ébullition, elles se remplissent de liquide au refroidissement.

On ensemence un tube de chaque sucre avec 2 gouttes d'une culture de 3 jours. On place à 25 °C. On vérifie tous les jours jusqu'au dixième l'apparition des bulles de gaz carbonique.

Assimilation des différents sucres. — Tous les sucres fermentés par une levure sont aussi assimilés, mais la réciproque n'est pas vraie. Ce test

s'applique aux sucres non fermentés, car certains peuvent subir à défaut d'une fermentation une assimilation oxydative.

Lodder (61) utilise la méthode auxanographique dans la pratique courante, réservant l'emploi des milieux liquides pour les cas difficiles. Nous avons préféré opérer toujours en milieu liquide avec un milieu entièrement synthétique.

Nous avons borné notre étude à celle des sucres non fermentés par la levure, mais Wickerham (123) et Wickerham et Burton (124) ont beaucoup allongé la liste des substances susceptibles d'être essayées dans ce test.

Le milieu de base contient les sels minéraux nécessaires sous forme de cendres de levures. Nous employons de la levure de boulangerie que nous faisons sécher puis calciner. On dissout 6 g de cendres charbonneuses par litre d'eau distillée, avec 6 g d'acide citrique. On fait bouillir 20 minutes. On filtre, on ajoute 2 g de SO_4 $(NH_4)_2$ et 3 g d'asparagine par litre puis les vitamines :

B_1	1 mg/l
B_6	1 mg/l
Acide paraaminobenzoïque	1 mg/l
Acide nicotinique	1 mg/l
Acide pantothénique	1 mg/l
Biotine	0,1 mg/l
Inositol	5 mg/l

On neutralise à pH 7 avec de la potasse. On ajoute le sucre considéré à raison de 5 g par litre. On répartit en tubes bien limpides et calibrés. La stérilisation doit être très rapide afin de ne pas détruire les facteurs de croissance : on porte la température à 110°, et ouvre l'autoclave dès qu'elle est descendue à 100°, on retire les tubes et les refroidit rapidement.

On ensemence avec 2 gouttes d'une culture de 3 jours, les tubes contenant les sucres non fermentés par la levure, plus un tube témoin avec glucose, plus un tube témoin sans aucun sucre, qui indiquent les limites du développement.

Au bout de 15 jours à 25°, on observe les résultats : on remet les dépôts en suspension et compare l'opacité des tubes. Dans certains cas, l'absorptiomètre permet de chiffrer des différences que l'œil ne perçoit pas.

Néanmoins, l'interprétation n'est pas toujours très nette, le dépôt est parfois important, même dans le milieu sans sucre.

Fermentation sélective du glucose et du fructose — Il est bien connu qu'en présence d'un mélange de glucose et de fructose, tel que le sucre inverti, les levures s'attaquent généralement d'abord au glucose, puis consomment le fructose : habituellement le sucre qui reste dans les vins blancs est surtout du fructose de sorte que le pouvoir rotatoire de ces vins est négatif. Cependant, Gayon et Dubourg (45) ont découvert en 1890 des levures qui dans une solution de sucre inverti choisissent d'abord le fructose. Dubourg trouve dans certains vins de Sauternes une levure

qui fait fermenter le fructose plus rapidement que le glucose. Il n'identifie pas cette levure qui sera dès lors désignée comme « levure de Sauternes ».

Nous avons identifié une souche de cette levure, fournie par l'Institut Pasteur : il s'agit de *Sacch. elegans*.

Dans une récente publication (81) nous avons comparé 28 espèces de levures isolées de la région de Sauternes au sujet de la fermentation du glucose et du fructose. Les levures se classent en trois groupes. *Sacch. acidifaciens*, *Sacch. elegans*, *Sacch. rouxii* et *Torulopsis bacillaris* font fermenter plus vite le fructose que le glucose. Pour un autre groupe la fermentation des deux sucres est du même ordre de grandeur ; enfin la plupart des levures font fermenter le glucose plus vite que le fructose.

La constance de ces caractères rend ce test utilisable pour l'identification.

Courbes de fermentation. — Pouvoir alcoogène. — Il est défini par le degré alcoolique maximum obtenu par la levure considérée dans un moût riche en sucre. On utilise du moût de raisin enrichi à 18-19° lorsqu'il s'agit de *Saccharomyces* ; du moût naturel (12 à 14°) pour les levures moins alcoogènes, du moût dilué à 10° pour les levures apiculées.

Les essais sont effectués dans de petites bouteilles de 90 cm^3 contenant 60 cm^3 du milieu choisi et qui ont été stérilisées rapidement à l'autoclave. On ensemence deux flacons avec 1 cm^3 de culture de trois jours. L'un est bouché d'un tampon d'ouate, réalisant la fermentation en aérobiose, le goulot du second est obturé d'un bouchon de caoutchouc traversé par un tube effilé bourré d'ouate : il réalise la fermentation en anaérobiose. On laisse fermenter à l'étuve à 25° C.

Le premier, le troisième, le sixième, le douzième et le vingt-cinquième jours on pèse les flacons de la fermentation anaérobie. La perte de poids, due au départ du gaz carbonique, permet de tracer une courbe qui reflète l'allure de la fermentation. On peut comparer ces pertes de poids à celles d'un flacon témoin contenant le même milieu, bouché de la même façon, mais non ensemencé, représentant la perte de poids par évaporation. Cette dernière est faible, et généralement négligeable. Il n'en est pas de même avec les flacons bouchés simplement d'un tampon d'ouate. De même, on ne peut apprécier, à cause de l'évaporation, le degré alcoolique produit en aérobiose, que par le calcul à partir du sucre consommé (17,5 g de sucre donnent 1° d'alcool par convention). Au bout de 45 jours, on détermine le degré alcoolique par ébulliométrie dans les flacons bouchés d'un tube effilé, l'acidité volatile produite et le sucre restant.

Ces résultats permettent de connaître l'activité fermentative de la levure, son importance et sa valeur dans la vinification.

Influence de divers facteurs sur le pouvoir alcoogène des levures. — Avec une même levure expérimentée en plusieurs exemplaires sur le même milieu préparé de la même façon, on observe de notables différences, s'élevant jusqu'à 1°8 d'alcool dans le pouvoir alcoogène de la levure. Nous avons donc cherché quels pouvaient être les facteurs influant sur cette propriété.

Le chauffage du moût au cours de la stérilisation, nous semblait avoir une importance. Des essais ont été conduits sur des moûts soumis à des températures et à des temps de chauffage différents. On a comparé le moût chauffé, à 100° pendant 15 minutes, à 120° pendant 15 minutes et à 120° pendant 60 minutes.

Le chauffage à 120°, même prolongé peu de temps, diminue la fermentescibilité, les degrés obtenus sont plus faibles ; de plus, l'acidité volatile formée est plus élevée. La même action s'observe dans les deux conditions d'aération. Par contre le chauffage à 100° ne paraît pas avoir d'influence appréciable.

Le vieillissement du milieu de culture abandonné pendant un mois à la température ordinaire, en flacons incomplètement pleins, bouchés d'ouate et capuchonnés de papier filtre, ne semble pas non plus avoir d'influence marquée sur la fermentescibilité et d'autre part la conservation du moût en glacière ne présente pas d'avantage.

Afin de voir l'influence de l'âge du levain, on a ensemencé les flacons avec des cultures de la même levure âgées de trois jours, 6 jours, 12 jours, 20 jours, 30 jours. Le départ de la fermentation est beaucoup plus rapide avec les levains les plus jeunes, mais à la fin de l'épreuve, les degrés alcooliques et les acidités volatiles sont pratiquement les mêmes.

A la suite des récentes expériences de RANKINE (85) sur les levures de vin, nous avons fait fermenter comparativement, en cinq exemplaires, quatre souches de *Sacch. ellipsoïdeus* isolées en Gironde. Les courbes de fermentation parfois voisines pour une même levure, s'écartent aussi notablement dans certains cas et on enregistre des différences de 4,5 g à 39 g dans le sucre fermenté par une même levure. Les degrés extrêmes obtenus varient de 1°8 à l'abri de l'air, de 1°5 à l'air. Il y a relativement moins d'écart entre les acidités volatiles.

Il est donc nécessaire de faire plusieurs déterminations parallèles, comme le préconise RANKINE ; il semble logique de choisir le degré alcoolique maximum pour définir la levure.

Assimilation des nitrates — L'assimilation des nitrates est une propriété que de nombreux auteurs ont utilisée en taxinomie des levures à cause de sa fidélité.

La plupart des genres n'assimilent pas les nitrates : *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*. Par contre, le genre *Hansenula*

est caractérisé par son aptitude à assimiler les nitrates. Cela permet en particulier de le distinguer des *Pichia* qui présentent les mêmes autres caractères. Nous n'avons donc vraiment utilisé ce test que pour ces deux genres, ainsi que pour les *Brettanomyces*.

Stelling-Dekker opère en milieu solide, Lodder emploie la méthode auxanographique pour la pratique courante, ne se servant du milieu liquide mis au point par Wickerham que pour les cas douteux. Nous avons opéré toujours en milieu liquide. On sait qu'en présence de vitamines la plupart des levures peuvent assimiler le sulfate d'ammonium, l'urée et l'asparagine. Afin de connaître les limites du développement, dans des cas douteux toujours possibles, nous avons fait nos essais avec deux témoins, l'un sans aucune substance azotée, l'autre avec une addition de sulfate d'ammonium. Pratiquement, il n'y a jamais eu de cas douteux pour les levures que nous avons étudiées.

C'est un milieu entièrement synthétique dont Lodder et K-Van Rij ont donné la formule :

PO_4H_2K	1 p. 1000
$SO_4Mg, 7H_2O$	0,5 p. 1000
$Cl_2Ca, 2H_2O$	0,1 p. 1000
ClNa	0,1 p. 1000
Glucose	10 p. 1000

Vitamines à la même dose que pour l'assimilation des sucres.

La solution est faite dans de l'eau distillée. On ajoute :

NO_3K	0,78 p. 1000
ou $SO_4(NH_4)_2$	1 p. 1000

On répartit en tubes calibrés bouchés d'un tampon d'ouate. On stérilise très rapidement comme pour le milieu destiné à l'assimilation des sucres.

On ensemence un tube de chaque milieu avec deux gouttes de culture de 3 jours. Au bout de 15 jours à 25° C on observe l'intensité du trouble produit. Le témoin sans nitrate et le témoin avec sel d'ammonium indiquent le minimum et le maximum du développement.

Utilisation de l'alcool éthylique comme seule source de carbone. — Ce test n'a qu'une valeur secondaire dans l'identification des levures ; cette propriété, en effet, appartient à quelques espèces disséminées dans plusieurs genres.

Milieu :

PO_4H_2K	1 p. 1000
$SO_4Mg, 7$ aq	0,5 p. 1000
$SO_4(NH_4)2$	1 p. 1000

Les vitamines sont utilisées à la dose habituelle. On répartit en tubes calibrés et stérilise très rapidement. Au moment de l'emploi on ajoute la

dose d'alcool, 3 p. 100. On ensemence avec 2 gouttes de culture de 3 jours un tube témoin sans alcool et un tube avec alcool.

On observe les résultats au bout de une ou de deux semaines à 25°C. Il se produit toujours, même en l'absence d'alcool, un développement important ce qui rend l'interprétation parfois difficile.

Bilan des produits secondaires. Besoins en facteurs de croissance. — Nous ne ferons pas état ici des renseignements donnés par l'analyse des produits secondaires formés, qui ont été exploités ailleurs (56), ni par la détermination des besoins en facteurs de croissance (57). Cependant, nous avons parfois utilisé ces données physiologiques pour l'identification et la classification de quelques espèces difficiles.

Chapitre III

DESCRIPTION DES ESPÈCES DE LEVURES ISOLÉES

En employant les méthodes décrites précédemment, nous avons examiné les levures prélevées sur 96 moûts de la région bordelaise et sur 70 échantillons de vins en refermentation qui feront l'objet du chapitre VIII.

Notre étude générale nous a permis d'isoler 2138 souches de levures. Elles se répartissent entre 6 genres sporogènes et 5 genres non sporogènes. Nous avons groupé ensemble sans les étudier complètement, 110 souches qui n'avaient pas d'action fermentative. 31 espèces sont représentées,elles sont décrites en détail dans ce chapitre qui comporte également les photographies et les dessins que nous avons réalisés. En voici la liste et la place qu'elles occupent dans la classification générale qui se ramifie, rappelons-le, en familles, sous-familles, tribus, genres et espèces.

Les levures sporogènes constituent la famille des *Saccharomycetaceae* qui comprend cinq sous-familles : *Eremascoideae, Endomycetoideae, Saccharomycetoideae, Nematosporoideae, Lipomycetoideae.* Les levures de vin appartiennent à la seule sous-famille *Saccharomycetoideae,* qui se divise en trois tribus : *Endomycopseae, Saccharomyceteae* et *Nadsonieae.* Les deux dernières fournissent les levures de vin et chacune d'elles se compose de divers genres et espèces.

Tribu des *Saccharomyceteae* :

Genre *Saccharomyces* : *ellipsoïdeus, oviformis, bayanus, chevalieri, fructuum, carlsbergensis, uvarum, florentinus, steineri, heterogenicus, acidifaciens elegans, veronae, rouxii.*

Genre *Torulaspora* : *rosei, delbrueckii.*

Genre *Pichia* : *fermentans, membranaefaciens.*

Genre *Hansenula* : *anomala.*

Genre *Debaryomyces* : *hansenii.*

Tribu des *Nadsonieae* :

Genre *Saccharomycodes* : *ludwigii.*

Les levures non sporogènes constituent la famille des *Cryptococcaceae* et les levures identifiées se trouvent dans les sous-familles *Cryptococcoideae* et *Rhodotoruloideae* qui se divisent directement en genres :

Genre *Torulopsis* : *bacillaris, famata.*

Genre *Brettanomyces* : *vini, schanderlii.*

Genre *Candida* : *pulcherrima, mycoderma.*

Genre *Kloeckera* : *apiculata, africana, jensenii.*

Genre *Rhodotorula* : *mucilaginosa.*

I. — LEVURES SPOROGÈNES

Genre Saccharomyces Reess.

Ce genre est le plus courant et le plus abondant : nous avons trouvé 15 espèces de *Saccharomyces*.

Saccharomyces ellipsoïdeus.

Le nom le plus exact de cette espèce de levure est d'après la nomenclature moderne : *Saccharomyces cerevisiae* Hansen var. *ellipsoïdeus* (Hansen) Dekker. Mais comme il nous a paru incorrect de donner le nom de *cerevisiae* ou levures de bière, aux levures qu'on trouve sur les raisins, dans les vendanges en fermentation et dans les vins, nous emploierons de préférence pour les désigner le terme de *Saccharomyces ellipsoïdeus*.

Sur moût de raisin, après 3 jours de culture à 25°, les cellules sont elliptiques 9 × 8 à 5 × 4 μ, quelques-unes sont plus allongées, d'autres plus arrondies. Elles se présentent isolées ou par deux, le bourgeon restant adhérent à la cellule mère pendant quelque temps. Le liquide est légèrement trouble et recouvert d'une mousse fine, mais les caractères de sédimentation sont variables d'une souche à l'autre. Sur une culture plus âgée on ne note jamais de voile, mais il peut rester sur le tube, un anneau formé par les levures soulevées par la mousse au cours de la fermentation active. En milieu solide, malt gélosé, les cultures sont blanches, humides, plus ou moins lisses ou granuleuses, il y a peu de découpures ou des lobes peu marqués. Au bout d'un mois on peut observer des asques contenant de 1 à 4 spores, et des cellules granulées.

Sur moût gélatiné, les colonies peuvent être mates ou brillantes, elles sont en général assez grosses, souvent saillantes, ou même en forme de pain de sucre. La colonie géante se présente sous forme d'une colonie ronde plus ou moins ramifiée ou étoilée ; le centre est creux ou au contraire surélevé.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose et raffinose pour un tiers ; l'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile : ces deux caractères sont très variables suivant les souches et les origines.

	18 C Médoc		19 J Pomerol		19 X Sauternes	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
	—	—	—	—	—	—
Air.....	8°0	0,92	13°0	1,53	16°5	1,32
Abri de l'air...	7°6	0,80	10°0	1,53	12°1	1,35

Fermentation sélective des sucres : 81 p. 100 du glucose a fermenté lorsque 50 p. 100 du fructose a disparu.

Saccharomyces oviformis OSTERWALDER.

Sur moût de raisin, 3 jours à 25° : cellules isolées ou par deux, le bourgeon restant accolé à la cellule mère. Dimensions de 9 × 7 à 5 × 4 μ, les plus grosses cellules étant les plus nombreuses. Les cellules allongées sont assez rares. Le liquide est trouble, la mousse fine ; puis le trouble sédimente et dans une culture plus âgée le liquide est limpide ayant laissé parfois quelques traces de ses niveaux antérieurs. En moût de bière gélosé, l'aspect des cellules est identique. La culture sur ce milieu solide n'est généralement pas lisse, surtout au centre ; elle est plus ou moins brillante, blanc crémeux ; il y a quelques lobes, en général peu marqués, et de fines ramifications au bord de la culture. La sporulation est plus facile à observer sur eau de carotte gélosée que sur malt gélosé : 1 à 4 spores en général.

Sur moût de raisin gélatiné les colonies prélevées en surface sont souvent en relief, mates, mais parfois aussi plates et brillantes. Les colonies géantes sur moût de raisin gélatiné ne sont pas caractéristiques, et ne se distinguent pas de celles des autres *Saccharomyces*.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose et raffinose pour un tiers. Le galactose n'a pas fermenté, et n'est pas assimilé. L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	15 XVI Sainte Foy la Grande		8 XIV Haut Montravel		19 XIII Sauternes	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
	—	—	—	—	—	—
Air.....	18°3	1,19	15°3	0,98	17°8	1,10
Abri de l'air...	12°5	1,04	12°2	0,67	12°4	0,86

Il y a quelques variations dans ces caractères, mais d'une façon générale les souches de *Sacch. oviformis* ont des pouvoirs alcoogènes très élevés. On les trouve surtout à la fin de la fermentation.

Fermentation sélective des sucres : cette espèce fait fermenter 81 p. 100 du glucose lorsque 50 p. 100 du fructose est consommé.

Saccharomyces bayanus SACCARDO.

Sur moût de raisin, 6 jours à 25° : les cellules sont elliptiques 8 × 7 à 5 × 4 μ, isolées ou groupées par deux. Sur malt gélosé, la culture a une surface plus ou moins lisse avec des granulations, parfois des trous. Les spores sont au nombre de 1 à 4. Sur moût gélatiné, les colonies peuvent être brillantes, en relief. Les colonies géantes sur moût gélatiné ont un centre creux entouré d'un bourrelet, puis d'une bordure à cannelures et festons réguliers.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, raffinose pour un tiers. Le galactose n'a pas fermenté, et n'est pas assimilé.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile.

	14 C Médoc		14 E Médoc		20 E Médoc	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
	—	—	—	—	—	—
Air.....	13°0	1,90	13°3	1,90	12°8	1,84
Abri de l'air...	11°4	1,65	11°9	1,35	11°3	1,50

Fermentation sélective : 84 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

DISCUSSION. — Les trois souches de *Sacch. bayanus* isolées ne présentent pas d'après les tests employés habituellement de différences fondamentales avec *Sacch. oviformis*. Mais les besoins en facteurs de croissance déterminés par ailleurs par Mlle LAFOURCADE (57), les pouvoirs alcoogènes et la formation d'acidité volatile se sont montrés si différents que nous avons maintenu ces trois levures parmi l'espèce *Sacch. bayanus*.

Saccharomyces chevalieri GUILLIERMOND.

En moût de raisin au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont isolées ou par deux (cellule mère et bourgeon) 10 × 8, 8 × 6 à 5 × 4 μ, de forme elliptique. Le liquide est trouble et la mousse fine ; la sédimentation se fait assez rapidement laissant le liquide limpide et quelques dépôts sur la paroi du tube. En moût de bière gélosé, l'aspect des cellules est identique. La culture présente quelques rides dans la partie centrale tandis que la bordure est plate, plus ou moins brillante et les lobes sont peu marqués. La sporulation est fréquente sur malt gélosé et eau de carotte gélosée : 1 à 4 spores. Sur moût gélatiné les colonies peuvent présenter tous les aspects : mats ou brillants, plats ou en relief. Les colonies géantes sur moût gélatiné, présentent un creux central et des ramifications arborescentes ; elles sont mates ou brillantes.

Fermentation et assimilation des glucose, saccharose, galactose, raffinose pour un tiers. Le maltose n'a pas fermenté, et n'est pas assimilé. L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

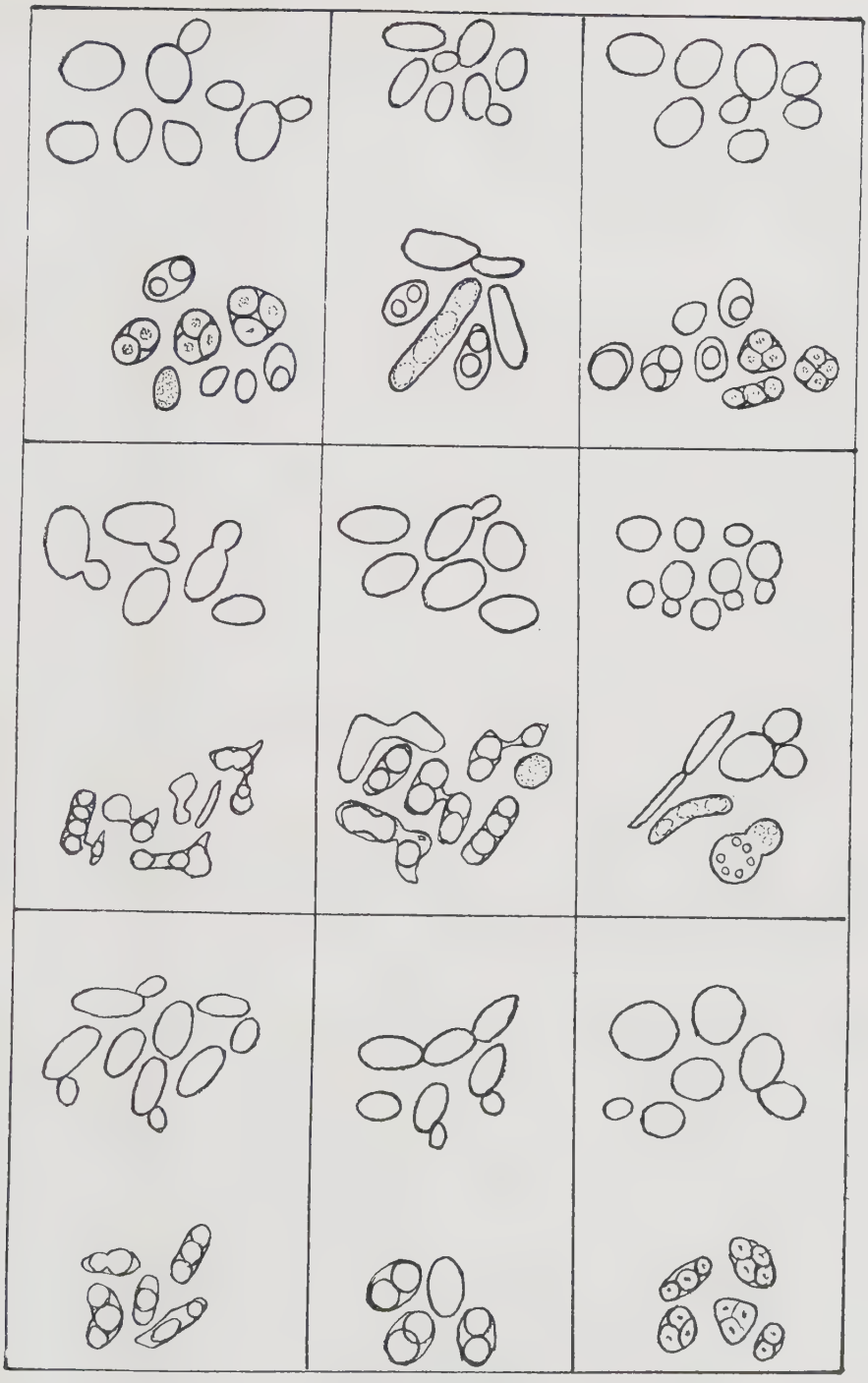
Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile : ces deux caractères sont assez variables selon les souches.

	20 B Médoc		2 VII Saint Emilion		17 VII Barsac	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
	—	—	—	—	—	—
Air.....	13°3	1,90	12°5	1,90	15°2	1,35
Abri de l'air...	11°1	1,40	11°0	1,47	11°7	0,95

Fermentation sélective : 84 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Saccharomyces fructuum LODDER et K-VAN RIJ.

Au bout de 3 jours à 25°, sur moût de raisin, les cellules sont grosses,



Dessins à l'échelle 1 000

En haut : culture sur moût de raisin. en bas : culture sur milieu solide. Par colonnes à partir de la gauche *Sacch. oviformis, S. acidifaciens, S. heterogenicus, — Sacch. uvarum, Sacch. elegans, Sacch. steineri, — Sacch. chevalieri, Sacch. veronae, Sacch. ellipsoïdeus.*

plutôt allongées, isolées ou par petites chaînes de 2 à 3 éléments : 10 × 6 à 6 × 4 μ. Sur malt gélosé, les cellules ont le même aspect qu'en milieu liquide. La sporulation est assez facile à observer : les asques renferment de 1 à 3 spores. Sur moût de raisin le liquide se trouble au bout de 3 jours ; le sixième jour, la sédimentation n'est pas toujours terminée. Plus tard, le liquide est tout à fait limpide : on relève quelques dépôts sur les parois du tube. Sur malt gélosé, les cultures sont en général lisses, brillantes, peu découpées ; sur eau de carotte gélosée, elles sont plus plissées, ridées. Les colonies géantes sur moût gélatiné ont un centre creux entouré d'une zone blanche, sèche, finement ramifiée, plus ou moins largement découpée.

Fermentation et assimilation des glucose, saccharose, galactose et raffinose pour un tiers. Le maltose n'a pas fermenté, mais il est assimilé. L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	6 XIV Médoc		5 F Saint-Emilion		8 VI Entre-Deux-Mers	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
	—	—	—	—	—	—
Air.....	11°1	1,65	13°9	2,02	15°4	0,92
Abri de l'air...	8°2	1,47	10°8	1,41	8°8	0,98

Fermentation sélective : 84 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Remarque. — *Sacch. fructuum* ne se distingue de *Sacch. chevalieri* que par le test d'assimilation du maltose qui est positif pour *Sacch. fructuum*, négatif pour *Sacch. chevalieri*.

Saccharomyces carlsbergensis Hansen.

Sur moût de raisin, 3 jours à 25°, les cellules sont isolées ou en chaînes de 2 à 4 ou 5 éléments. Elles sont assez grosses, plutôt allongées, 11 × 9 et 11 × 6 à 6 × 5 μ ; sur malt gélosé, l'aspect est le même qu'en milieu liquide. Les spores ont été observées, il y en a de 1 à 4 par asque. La culture en milieu liquide est trouble au bout de 3 jours, mais la sédimentation se fait vite et par la suite, le liquide devient parfaitement limpide. En milieu solide la culture est lisse, humide, brillante, d'un blanc crémeux, parfois un peu festonnée. Sur moût gélatiné, les colonies monocellulaires sont en général grosses, mates et en piton. La colonie géante présente un grand creux central ; elle est peu découpée, développée presque entièrement dans la profondeur de la gélatine et finement ramifiée. Il peut y avoir des lobes larges et des zones concentriques.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose et raffinose complètement.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	10 C Monbazillac		8 VII Entre-Deux-Mers		14 V Graves blancs	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
	—	—	—	—	—	—
Air.....	9°8	0,86	11°4	0,88	7°3	0,86
Abri de l'air	7°5	0,61	6°7	0,43	6°7	0,61

Fermentation sélective : 86 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Saccharomyces uvarum Beijerinck.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont ovales, quelques-unes sont beaucoup plus allongées ; elles sont groupées parfois en chaînes de 2 éléments : 9× 4, 8 × 6, 5 × 3, 15 × 3 μ. Sur malt gélosé, l'aspect des cellules est le même. La sporulation n'a pas toujours été visible, mais nous avons pu cependant observer sur eau de carotte de 1 à 4 spores. Sur moût de raisin, le liquide, trouble au bout de 3 jours, se clarifie par la suite ; au bout d'un mois il est limpide et l'on observe des anneaux blancs et parfois un voile. En milieu solide, la culture est mate, beige foncé, sans relief, unie, mais elle peut être finement ridée au centre, alors que la bordure est plate et mince, sur eau de carotte gélosée. Sur moût de raisin gélatiné, *Sacch. uvarum* s'est développé en grosses colonies mates. Les colonies géantes sur moût gélatiné sont minces, assez grosses, mais peu découpées et sans grand relief.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose et raffinose complètement.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'alcool sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	7 I Entre-Deux-Mers		18 D Médoc		20 C Médoc	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
	—	—	—	—	—	—
Air.....	8°0	0,67	7°1	1,04	9°3	1,04
Abri de l'air	7°9	0,55	7°7	0,82	7°4	0,86

Fermentation sélective : 85 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Saccharomyces florentinus (Castelli) Lodder et K-Van Rij.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont rondes à elliptiques, plutôt petites, isolées ou groupées par deux 6 × 5, 5 × 4, 4 × 4, 4 × 3 μ. Sur malt gélosé, les cellules ont à peu près le même aspect, mais elles sont plus petites et plus groupées. Nous avons pu observer la sporulation sur eau de carotte : des asques à deux et trois spores étaient visibles. Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, le liquide est

légèrement trouble, mais la sédimentation se produit rapidement et au bout de 6 jours les dépôts compacts de cellules sont difficiles à désagréger par agitation. Sur malt gélosé, la culture est blanche, brillante, humide, avec un certain relief, elle forme des lobes plus ou moins bien marqués. Sur moût gélatiné, la colonie géante est large, mince, elle forme de larges lobes, bordés de fines ramifications.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose, et raffinose complètement.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	16 A Médoc		1 e 4 Médoc		5 O 1ères Côtes de Bordeaux Blanc	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
	—	—	—	—	—	—
Air.....	9°3	0,95	13°9	1,28	9°0	0,30
Abri de l'air	6°3	0,80	11°9	1,00	8°1	0,12

Discussion. — Nous nous trouvons en présence de levures ayant une même propriété caractéristique, celle de faire fermenter le mélibiose et par conséquent le raffinose entièrement. La classification nous donne quatre identifications possibles : *Sacch. florentinus, carlsbergensis, logos, uvarum.* Si l'hypothèse *Sacch. logos* peut être aisément écartée à cause de la dimension des cellules et par le fait que cette espèce n'a jamais été trouvée dans le vin, le choix parmi les autres est plus difficile.

En considérant la forme des cellules et le pouvoir alcoogène, nous pouvons discerner parmi les levures isolées : des souches de *Sacch. florentinus* : petites cellules presque rondes qui conservent cet aspect en culture âgée sur malt gélosé,

— des souches de *Sacch. uvarum* qui montrent des formes allongées analogues à celles de la souche authentique du C. B. S.,

— enfin, nous groupons parmi les *Sacch. carlsbergensis* toutes les autres souches qui ont des cellules assez grosses, se rapprochant de la souche du C. B. S. Les pouvoirs fermentatifs sont en général un peu plus élevés.

Saccharomyces steineri Lodder et K-Van Rij et *Saccharomyces italicus* Castelli.

L'identification des souches répondant aux caractéristiques de *Sacch. steineri* et de *Sacch. italicus* s'est montrée particulièrement délicate. Ces deux levures, de découverte assez récente, ne se différencient que dans la manière de faire fermenter le saccharose. D'après Castelli, la fermentation du saccharose est nulle avec *Sacch. italicus*, elle est nulle ou très faible d'après Lodder et K-Van Rij, mais l'assimilation aérobie est positive ; quant à *Sacch. steineri*, il fait fermenter activement le

saccharose. La distinction semble donc reposer sur le fait que *Sacch. italicus* ne possède pas d'invertase alors que *Sacch. steineri* possède cet enzyme.

En réalité, il nous est apparu que les souches authentiques de *Sacch. italicus*, fournies par le C B S ou dont l'identification a été confirmée par CASTELLI, arrivent toujours à faire fermenter des traces de saccharose dans le test habituel en milieu au bouillon de levure. Il suffit de prolonger 8 ou 15 jours les observations pour obtenir un dégagement visible de gaz carbonique dans la clochette de Durham. De plus, on constate qu'il y a tous les intermédiaires dans la vitesse de fermentation du saccharose sur bouillon de levure, lorsqu'on étudie une série de souches isolées de raisins de la Gironde.

En opérant en milieu synthétique complet, dans lequel l'azote se trouve uniquement sous forme de sels d'ammonium et d'asparagine, on s'aperçoit que *Sacch. italicus* fait fermenter aussi bien le saccharose que *Sacch. steineri* : le départ de la fermentation est pratiquement aussi rapide et la quantité de saccharose fermenté est la même.

La production de saccharase par ces levures dépend donc étroitement de la composition du milieu de fermentation. Une étude plus complète a été consacrée à ce problème. Nous pensons en conséquence qu'il n'y a pas lieu de conserver la distinction entre ces deux espèces que nous grouperons sous le nom de *Sacch. steineri*, Steiner ayant eu l'antériorité de sa découverte en 1924.

DESCRIPTION. — Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont plutôt allongées, isolées ou groupées par deux, 10 × 4 à 5 μ à 6 × 5 μ. Sur malt gélosé les cellules ont un aspect à peu près identique. La sporulation s'observe assez difficilement, néanmoins on a trouvé des asques à une et deux spores. Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, le liquide est limpide, les levures forment au fond du tube des amas faciles à désagréger et un anneau au-dessus de la mousse. Au bout d'un mois le liquide est limpide et on peut observer des dépôts sur la paroi des tubes. Sur malt gélosé et eau de carotte gélosée, les cultures peuvent être blanches ou colorées (beige ou blanc jaunâtre), lisses ou plus ou moins granuleuses, parfois même ridées, mais la bordure est toujours lisse, ramifiée ou non.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose (parfois très faible sur eau de levure), galactose. Le raffinose n'a pas fermenté.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'alcool sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile.

	144 C B S		15 C Médoc		6 XI Saint-Emilion	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air.....	11°8	1,32	12°3	1,84	14°2	1,35
Abri de l'air	11°2	1,14	12°0	1,40	10°4	1,16

Fermentation sélective : 84 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Saccharomyces heterogenicus OSTERWALDER.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont allongées, isolées ou par deux ; 10 × 3 ou 4 µ, 8 × 4 ou 3 jusqu'à 5 × 4 µ. Sur malt gélosé, les cellules ont à peu près le même aspect. La sporulation est visible sur malt gélosé et sur eau de carotte gélosée : 1 à 4 spores rondes par asque. Sur moût de raisin, le liquide au bout de trois jours est légèrement troublé par des levures en flocons ; au bout de 6 jours, le trouble persiste ; par la suite, au bout d'un mois, le liquide est limpide et de légères traces restent sur le tube. En milieu solide la culture est unie, lisse, sauf dans la partie centrale un peu plus épaisse et un peu plus granulée ; il n'y a pas de découpures mais parfois de fines ramifications sous la gélose. Sur eau de carotte les cultures sont blanches, mates, plus ou moins ridées. Les colonies géantes ne présentent rien de caractéristique, même sur moût gélatiné.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose et saccharose. Le galactose n'a pas fermenté, et n'est pas assimilé ; le raffinose n'a pas fermenté.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	14 D Graves		17 XVIII Barsac		23 XI Sauternes	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air.....	14°8	0,98	14°5	1,22	11°0	0,06
Abri de l'air	11°7	0,79	10°4	0,92	9°9	0,46

Fermentation sélective : 83 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

DISCUSSION. — Les caractères morphologiques des *Sacch. heterogenicus* trouvés en Gironde ne correspondent pas tout à fait à la description donnée par LODDER et K-VAN RIJ, ces levures ont une forme généralement plus arrondie, plus elliptique que la souche authentique. Mais leurs propriétés fermentatives et en particulier leur capacité de faire fermenter le saccharose et de ne pouvoir attaquer le raffinose, correspondent parfaitement à la diagnose de cette espèce.

Saccharomyces acidifaciens (NICKERSON) LODDER et K- VAN RIJ.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont grosses, allongées, isolées ou groupées par deux, 10 × 6 à 7 × 5 µ et 5 × 4 µ ; les petites cellules sont plutôt arrondies. Sur malt gélosé, l'aspect des cellules est semblable. La sporulation est facile à observer sur malt gélosé et sur milieu à l'eau de carotte. Les asques contiennent de 1 à 4 spores

rondes. En général, la formation de l'asque est précédée par une conjugaison isogamique ; parfois c'est une conjugaison hétérogamique et parfois, même, la formation de l'asque n'est pas précédée par la conjugaison. Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, le liquide peut être légèrement trouble ou limpide. Au bout de 6 jours, le liquide est surmonté de grosses bulles irisées, formant une mousse stable, et qui se maintiennent longtemps et très haut dans le tube. Cette propriété a été observée chaque fois que *Sacch. acidifaciens* était cultivé sur moût de raisin ; mais cette mousse spéciale ne s'est jamais formée sur moût de bière.

Sur malt gélosé, les cultures sont plutôt mates, parfois légèrement colorées de jaune rosé, assez lisses, sans découpures. Sur milieu de Malan, les cultures sont généralement blanches ou rosées, mates. Sur moût gélatiné, *Sacch. acidifaciens* forme de petites colonies. Les colonies géantes sur moût gélatiné sont amorphes, mates, légèrement rosées.

Fermentation et assimilation seulement du glucose. Les autres sucres ne fermentent pas et ne sont pas assimilés. On observe parfois une légère assimilation aérobie du galactose.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	142 C B S		12 X Monbazillac		22 XVII Sauternes	
	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile	Degré	Acidité volatile
Air.....	8°2	0,60	8°2	0,24	9°0	1,10
Abri de l'air	3°8	0,81	10°0	0,21	9°7	1,04

Fermentation sélective : contrairement aux *Saccharomyces* déjà décrits, cette levure n'a fait fermenter que 6 p. 100 du glucose alors que déjà 50 p. 100 du fructose a disparu.

Saccharomyces elegans Lodder et K-Van Rij.

Sur du moût de raisin au bout de 3 jours à 25°, les cellules elliptiques sont allongées ; elles sont isolées ou groupées par deux 10 × 4 à 7 × 5 μ ; sur malt gélosé, les cellules sont plus courtes. La sporulation est facile à observer sur malt gélosé et sur eau de carotte gélosée. Il y a deux à quatre spores par asque, grosses et rondes. Une conjugaison isogamique précède la formation de l'asque. Sur moût de raisin, au bout de 3 jours le liquide est généralement limpide avec des levures en flocons en suspension, et en dépôt. Au bout de 6 jours environ apparaissent de grosses bulles irisées qui se maintiennent très longtemps et très haut dans le tube (propriété commune avec *Sacch. acidifaciens*). Nous ne les avons pas observées sur moût de bière. Le liquide au bout d'un mois est limpide avec de légers dépôts laissés sur les parois par les bulles. Sur malt gélosé la culture est blanche, parfois légèrement colorée, avec des granulations fines ou quelques rides, et quelques lobes. Ces colonies isolées sur moût

gélatiné étaient petites, parfois granuleuses et festonnées. Les colonies géantes sur moût gélatiné sont rosées, amorphes, avec quelques petits festons mais aucune ramification.

Fermentation et assimilation des glucose et saccharose. Par contre, le galactose, le maltose et le raffinose ne fermentent pas et ne sont pas assimilés.

L'assimilation des nitrates est nulle. L'assimilation de l'éthanol également ou devient faiblement positive à la longue.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	143 C B S		23 E Sauternes		20 VIII Sauternes	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
	—	—	—	—	—	—
Air.....	10°8	0,48	13°0	1,10	11°0	0,12
Abri de l'air	7°9	0,60	10°0	0,98	10°5	0,37

Fermentation sélective : 6 p. 100 du glucose seulement fermentent pour 50 p. 100 du fructose.

Discussion. — Dans une solution de sucre inverti *Sacch. acidifaciens* et *Sacch. elegans* possèdent en commun la propriété de faire fermenter sélectivement le fructose d'une façon très nette. Au cours des tests de fermentation, nous avons pu avoir parfois quelques difficultés à distinguer les deux espèces qui ne sont séparées que par la capacité de *Sacch. elegans* à faire fermenter le saccharose, parfois faiblement.

Ces deux levures ont également en commun une propriété que nous n'avons vue décrite nulle part, sans doute parce que le milieu moût de raisin est peu employé, celle de former une mousse stable faite de grosses bulles irisées. Le pouvoir alcoogène de *Sacch. elegans* est un peu plus élevé que celui de *Sacch. acidifaciens*.

Saccharomyces veronae Lodder et K-Van Rij.

Sur moût de raisin au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont à peu près rondes : 6 × 5 à 4 × 3 et 3 × 3 µ, isolées, ou groupées par deux. Sur malt gélosé, les cellules ont un aspect identique. La sporulation a été difficile à observer : 1 à 4 spores. Sur moût de raisin, le liquide est limpide laissant quelques dépôts sur la paroi. Sur malt gélosé : la culture est blanc jaunâtre, assez épaisse, assez brillante, mais pas lisse, peu étendue. Des bulles crevées font apparaître des rides. Sur moût gélatiné, les colonies sont assez grosses en surface, petites et brunes dans la profondeur de la gélatine. La colonie géante sur moût gélatiné est mate, jaunâtre, assez grosse. Le centre est légèrement déprimé, mais avec de petites colonies rondes en relief ; la bordure cannelée est à peine découpée, un anneau saillant sépare le centre et la bordure.

Fermentation et assimilation des glucose et saccharose et du tiers du raffinose. Les maltose et galactose ne fermentent pas ou faiblement, mais ils sont assimilés.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	146 C B S		7 XI Sainte-Croix-Du-Mont	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air.....	10°8	0,14	8°6	0,18
Abri de l'air.....	6°5	0,45	8°5	0,09

Fermentation sélective : 58 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Sacch. veronae est le seul *Saccharomyces* qui fait fermenter à peu près également glucose et fructose.

Discussion. — La levure 7 XI de notre collection que nous avions classée comme *Sacch. veronae*, nous paraissant difficile à identifier, nous l'avons adressée au Prof. Castelli qui a confirmé qu'elle répondait aux caractéristiques de *Sacch. veronae*.

Au point de vue test de fermentation, nous avons pu constater que même après une purification supplémentaire par passage sur boîte de Pétri, cette souche finissait par faire fermenter tous les sucres au bout d'un temps plus ou moins long (tableau ci-dessous). Lodder et K-Van Rij signalent une fermentation possible du maltose, mais leur souche reste incapable de faire fermenter le galactose.

	Essai n° 1		Essai n° 2			Essai n° 3		
	2 jours.	21 jours.	1 jour.	7 jours.	13 jours.	1 jour.	7 jours.	13 jours.
Maltose.....	—	— + (1)	—	—	+ (3)	—	+ (4)	+
Galactose	—	+	—	+ (2)	+	—	—	+ (5)

(1) Devient + par agitation : remontée de bulles retenues dans le dépôt. — (2) Une bulle. — 3) Clochette entière. — (4) Une bulle. — (5) Quelques petites bulles.

Saccharomyces rouxii Boutroux.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont assez rondes, groupées en amas, 7 × 5 à 4 × 4 µ. Sur malt gélosé, les cellules présentent à peu près le même aspect. La sporulation est difficile à observer. Sur eau de carotte gélosée nous avons observé 1 à 3 spores. Sur moût de raisin on assiste, comme pour *Sacch. acidifaciens* et *Sacch. elegans*, à la formation d'une mousse irisée au-dessus des cultures. Sur malt gélosé, les cultures sont blanches, brillantes, mais granuleuses, tourmentées, avec des bulles éclatées. La colonie géante sur moût gélatiné est mate, légèrement rosée, avec des festons réguliers blancs.

Fermentation des glucose et maltose, assimilation des glucose, maltose et galactose. Le saccharose ne fermente pas et n'est pas assimilé.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	I Sirop de Cassis	
	Degré.	Acidité volatile.
Air	13°3	0,09
Abri de l'air	8°5	0,24

Fermentation sélective : 11 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose. Cette levure partage avec *Sacch. acidifaciens* et *Sacch. elegans* la propriété de faire fermenter sélectivement le fructose.

Genre Saccharomycodes Hansen.

On ne connaît qu'une seule levure appartenant à ce genre. Nous l'avons rencontrée dans les vins de Bordeaux.

Saccharomycodes ludwigii Hansen.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, à 25°, les cellules sont de forme apiculée, mais très grosses : 20 × 6, 18 × 5, 10 × 6, 8 × 4 μ. Elles sont isolées ou groupées par deux. Le bourgeon se forme à l'un des pôles. Sur malt gélosé, l'aspect des cellules est à peu près le même. La sporulation est facile à observer sur malt gélosé : il y a 3 ou 4 spores par asque, grosses et rondes. Sur moût de raisin, le liquide de culture est déjà limpide au bout de 3 jours. Par la suite, le dépôt est formé de flocons. Sur malt gélosé, la culture est beige, brillante, mais pas absolument lisse, quelques petites granulations. La colonie géante sur moût gélatiné est mate, légèrement rosée, plus ou moins épaisse, peu découpée ou avec des festons courts et petits.

Fermentation et assimilation des glucose, saccharose et raffinose pour un tiers. Les maltose et galactose ne fermentent pas et ne sont pas assimilés.

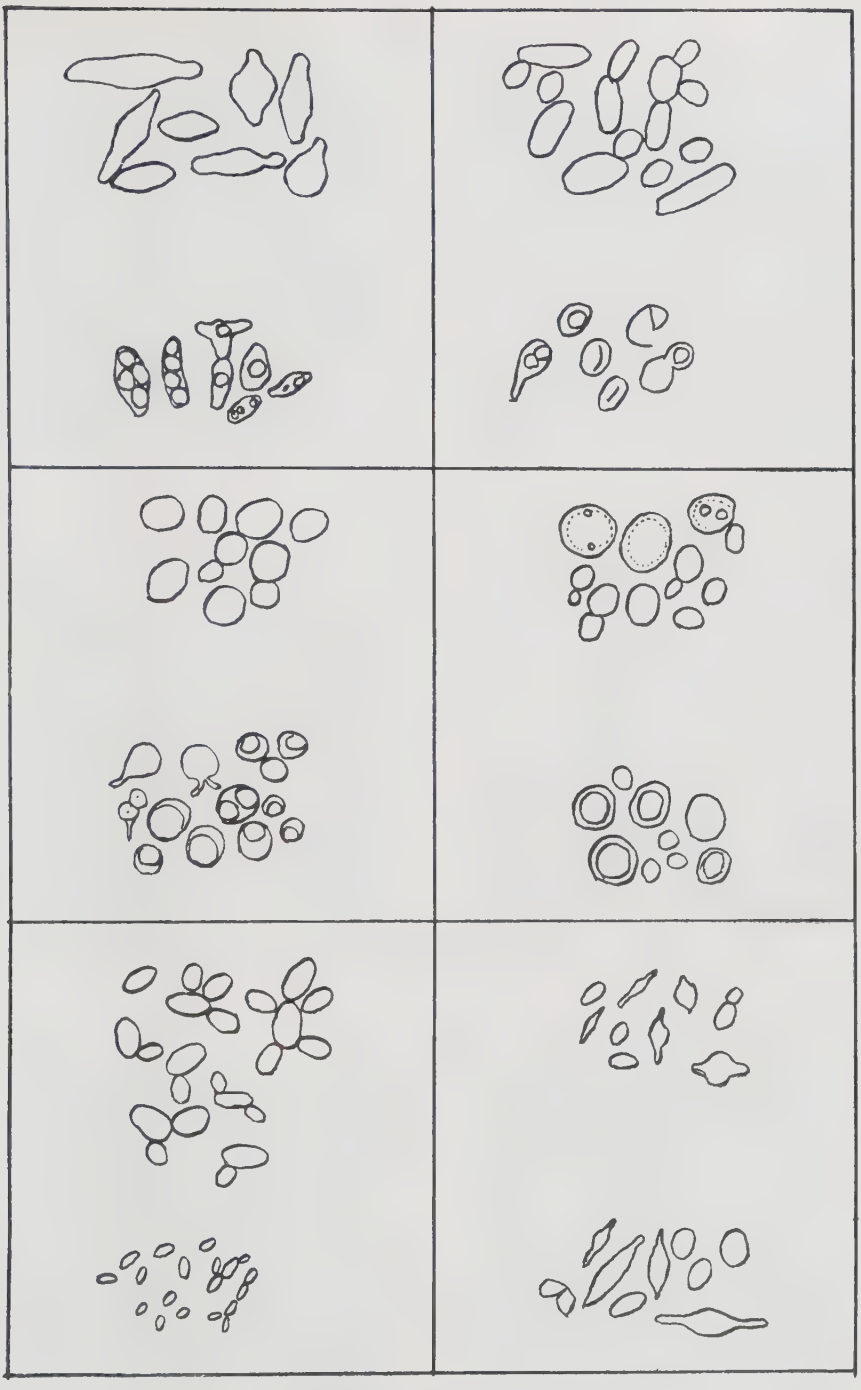
L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'alcool sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	6 XVII Entre-Deux-Mers		Vin blanc en cuve		Vin blanc en bouteille	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air	13°0	0,37	11°8	0,79	12°2	0,83
Abri de l'air	12°3	0,30	10°5	0,64	10°5	0,64

Fermentation sélective : 81 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Cette levure est rare lors de la fermentation du moût : nous n'en avons trouvé qu'une souche. Par contre elle est très fréquente dans la refermentation des vins sucrés. Elle a une résistance marquée à l'anhydride sulfureux.



Dessins à l'échelle 1 000

En haut : culture sur moût de raisin, en bas : culture sur milieu solide. Par colonnes à partir de la gauche *Saccharomycodes ludwigii, Torulaspora rosei, Torulopsis bacillaris, — Hansenula anomala, Candida pulcherrima, Kloeckera apiculata, Kloeckera africana,*

Genre Torulaspora Lindner.

Lodder et K-Van Rij n'ont pas conservé dans leur classification le genre *Torulaspora* et ont classé cette levure dans le genre *Saccharomyces*. Cependant, leur forme ronde, certains caractères physiologiques, notamment la formation pratiquement inexistante d'acide acétique, leurs besoins particuliers en facteurs de croissance, rendent ces levures très différentes des *Saccharomyces*. Avec les auteurs italiens, nous conservons donc le genre *Torulaspora* à cause de l'intérêt oenologique qu'il présente.

Il est représenté dans les vins par deux espèces.

Torulaspora rosei Guilliermond.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont à peu près rondes, 6 ×5, 5 ×5, 4 ×3 μ, isolées, groupées par deux ou en petits amas. Le bourgeonnement est souvent multipolaire. Sur malt gélosé, les cellules présentent le même aspect qu'en milieu liquide. La sporulation se produit sur malt gélosé, et sur milieu gélosé à l'eau de carotte. On observe sur les cellules qui sporulent des protubérances ressemblant à des tubes de conjugaison, mais il se produit aussi des conjugaisons isogamiques et hétérogamiques. On trouve dans les asques de une à trois spores rondes pas très grosses. Quand il n'y en a qu'une, elle est un peu excentrée. Nous avons pu observer un asque à 4 spores. Sur moût de raisin, au bout de 6 jours, le liquide est limpide, laissant quelques traces des niveaux antérieurs de la mousse et quelques dépôts sur les parois. Sur malt gélosé, la culture est lisse, blanc crème ; les bords sont lisses et forment quelques lobes. Par la suite, la culture est plus ou moins crème, lisse mais souvent avec de fines granulations, plutôt brillante, d'épaisseur uniforme.

Les colonies sont généralement petites et plates, sur moût gélatiné. Les colonies géantes sur moût gélatiné sont amorphes, roses ou crèmes, plus ou moins informes, assez minces ; le centre est assez large, la bordure est étroite, peu ramifiée ; elle devient blanche.

Fermentation et assimilation des glucose, saccharose et raffinose pour un tiers. Les maltose et galactose ne fermentent pas et ne sont pas assimilés.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	28 VI Puisseguin		3 F 1 ères Côtes de Bordeaux		2 XIV Graves	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air.....	11°7	0,03	8°4	0	13°0	0
Abri de l'air	8°3	0,06	6°6	0,18	12°7	0,24

On peut observer que ces levures forment un degré alcoolique assez élevé et une acidité volatile très faible. Elles ont donc un certain intérêt œnologique.

Photographies de cultures sur moût de raisin G = 1 000.

De haut en bas et par colonnes : *Kloeckera apiculata, Sacch. chevalieri, Torulaspora rosei. — To ulopsis bacillaris, Sacch. elegans, Saccharomycodes ludwigii.*

Fermentation sélective : 57 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Torulaspora delbrueckii LINDNER.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont plutôt rondes 9 × 7, 8 × 7 μ à 6 × 5, 6 × 4 μ. isolées ou groupées par deux. Sur malt gélosé elles ont le même aspect, mais présentent rapidement un granule brillant. La sporulation se produit mais les asques sont rares au milieu de cellules remplies de granulations ; ceux que nous avons observés contenaient deux spores.

La culture sur moût de raisin est limpide dès le début. Sur malt gélosé elle se développe d'abord sous forme d'une pâte blanche ou beige, brillante et lisse, avec quelques granulations au centre et des lobes à peine marqués, puis devient plutôt mate par la suite. La colonie géante sur moût gélatiné est assez informe, elle blanchit rapidement.

Fermentation et assimilation des glucose et galactose. Les maltose et saccharose ne fermentent pas et ne sont pas assimilés ; le raffinose ne fermente pas.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	I. IV. Premières Côtes	
	Degré.	Acidité volatile.
Air	13°7	0,73
Abri de l'air	11°0	1,07

Genres Hansenula et Pichia.

Ces levures forment des voiles à la surface du moût en fermentation. Les deux genres se différencient d'après l'assimilation des nitrates.

Hansenula anomala (HANSEN) SYDOW.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont plutôt allongées 10 × 3 à 4 × 3 μ. Le bourgeonnement se fait soit au pôle de la cellule, soit à côté. Les cellules sont isolées ou groupées par deux ou en chaînes. Sur moût de bière gélosé, les cellules ont à peu près le même aspect. La sporulation est visible sur malt gélosé, mais les spores en chapeau sont assez difficiles à observer. Sur moût de raisin, le liquide est trouble avec un voile très remontant, ridé. Au bout d'un mois, le liquide est trouble, le voile est plissé et remontant. Sur malt gélosé, la culture est blanche, mate, unie, sans découpures ou très abondante, de couleur crème, brillante, recouverte d'un voile mat plus ou moins ridé. La colonie géante sur moût gélatiné est humide, brillante, légèrement bombée, à peu près lisse.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose, et raffinose pour un tiers.

L'assimilation des nitrates est positive, ainsi que l'assimilation de l'éthanol.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	20 h 1 Pomerol		26 XII Puisseguin	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air	10°6	0,52	4°1	0,61
Abri de l'air	5°3	0,52	2°8	1,68

Fermentation sélective : 60 p. 100 de glucose pour 50 p. 100 de fructose.

Pichia fermentans LODDER.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont plutôt allongées 20 × 2 à 3 μ souvent disposées en chaînes arborescentes ; on observe également des cellules plus petites, elliptiques 8 × 5, 6 × 4, 3 × 2, 6 × 2 μ. Il y a souvent un granule brillant à l'intérieur des cellules. Sur malt gélosé, les cellules sont très longues, ramifiées en arborescences avec des cellules plus petites. La sporulation est assez difficile à observer. Les spores sont rondes. Sur moût de raisin, le liquide est trouble, le voile plissé (au bout de 3 jours) ; la culture a une odeur désagréable. Sur malt gélosé, la culture est blanchâtre, mince, mate, sèche avec des grains blancs. Elle devient jaune en vieillissant, sa surface est ridée ; la culture remonte sur le tube en un réseau finement ramifié. La colonie géante sur moût gélatiné est jaune, mate, mince avec un anneau un peu en relief.

Fermentation et assimilation seulement du glucose.

L'assimilation des nitrates est nulle, l'assimilation de l'éthanol est positive.

Pouvoir fermentatif et formation d'acidité volatile :

	4 p 1 Médoc		18 XVIII Médoc		7 P Ste-Croix-du-Mont	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air	11°1	0,73	13°0	0	10°7	0,37
Abri de l'air	7°7	0,73	9°3	0,51	5°1	0,70

Fermentation sélective : 84 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Pichia membranaefaciens HANSEN.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont allongées, en chaînes plus ou moins longues ou ramifiées 10 × 3 μ, 8 × 4, à 3 × 2 μ. Sur moût de bière gélosé, les cellules isolées sont plus arrondies qu'en

milieu liquide mais on observe aussi des formations arborescentes. Sur milieu de Gorodkowa, les cellules sont arrondies, tout à fait isolées ou groupées par deux. Les spores sont rondes, mais difficiles à observer. Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, le liquide est à peu près limpide, le voile plissé. Sur moût de bière gélosé, la culture est mate, très mince, très finement ridée, devenant colorée, brunâtre, avec de fines arborescences en surface.

Dans certains cas, les colonies sur moût gélatiné ont liquéfié la gélatine. Elles sont parfois mates, sèches, granuleuses, ou ridées, blanches ou jaunes. Les colonies géantes sur moût gélatiné peuvent avoir divers aspects : assez épaisses, amorphes avec une bordure un peu festonnée, ou minces, enfoncées dans la gélatine en plusieurs couches, mais très larges et portant de fins rayons et une bordure ramifiée arborescente, ou bien, colonie colorée au centre (légèrement orangée), entourée d'une zone grisâtre, puis d'une bordure régulière plus claire, mate, très finement ridée. Toutes les cultures liquides ou solides dégagent une forte odeur d'acétate d'amyle.

Fermentation et assimilation du glucose seulement.

L'assimilation des nitrates est nulle. L'assimilation de l'éthanol est positive.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	7 p 1 Saint-Émilion		8 p Saint-Émilion		20 p Sauternes	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air.....	9°0	0,27	7°8	0,86	8°6	0,18
Abri de l'air	2°3	0,46	3°0	1,04	1°8	0,52

Fermentation sélective : 54 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Discussion. — Le genre *Pichia* peut se différencier facilement du genre *Hansenula* par l'absence d'utilisation des nitrates.

Les espèces *P. fermentans* et *P. membranaefaciens* se distinguent par leur action sur le sucre inverti. *P. fermentans* a une préférence très nette pour le glucose tandis que *P. membranaefaciens* fait fermenter à peu près également les deux sucres. De plus, ces deux espèces sont différentes aux points de vue des intensités respiratoires et de fermentation (56).

Genre Debaryomyces.

Bien que non fermentative, nous avons étudié une souche de levure d'un voile, formant des spores.

Debaryomyces hansenii (Zopf) Lodder et K-Van Rij.

Sur moût de raisin au bout de 3 jours à 25°, les cellules mesurent

10 × 3, 15 × 4 μ à 6 × 4, 8 × 3, 5 × 4 μ. Sur malt gélosé, on peut observer 1 à 4 spores par asque. Sur moût de raisin, le liquide est limpide ou trouble, un voile plissé remontant est formé. Par agitation, il se désagrège en particules qui ont tendance à remonter. Pas de fermentation apparente. Sur malt gélosé, les colonies sont beige rosé, mates, très vermiculées et ridées. Les colonies géantes sont blanchâtres, non découpées, avec seulement quelques petits festons ; elles liquéfient la gélatine.

Fermentation très lente du glucose, nulle pour les autres sucres, mais ils sont tous assimilés.

L'assimilation des nitrates est nulle. L'assimilation de l'alcool est positive.

II. — LEVURES NON SPOROGÈNES

Kloeckera apiculata Janke.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules ont diverses formes, certaines sont elliptiques, petites, 3 × 2 μ ou plus allongées (6 × 3 μ), la plupart sont de forme apiculée, tandis que d'autres sont longues, minces, avec un renflement au milieu 10 × 6 μ, 10 × 3 μ. Sur malt gélosé, les cellules sont très petites. Sur moût de raisin, le liquide est limpide laissant des traces d'anneaux superficiels. Sur malt gélosé, les cultures sont très minces, brunâtres. Sur moût gélatiné, les colonies sont très petites et liquéfient la gélatine.

Fermentation et assimilation seulement du glucose. Les autres sucres ne fermentent pas et ne sont pas assimilés.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	2 a Saint-Emilion		7 1 Ste-Croix-du-Mont		16 a Médoc	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air.....	4°7	1,71	6°4	0,98	5°1	1,22
Abri de l'air	3°8	1,04	4°0	1,47	4°0	0,90

Fermentation sélective : 39 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Kloeckera africana Janke.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules ont des formes variées ; petites, elliptiques 4 × 2 et 5 × 4 μ, puis 8 × 6 μ, ou plus grosses et de forme apiculée 10 × 4, 15 × 4, 10 × 3 μ. Le liquide est légèrement trouble. Sur malt gélosé, la culture est beige, mince, humide, brillante. Sur moût gélatiné la colonie géante est très petite, mate, brune, granuleuse.

Fermentation seulement du glucose ; les glucose, maltose et saccharose sont assimilés, le galactose ne l'est pas.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	31 XII Premières Côtes de Bordeaux	
	Degré.	Acidité volatile.
Air	10°3	0,40
Abri de l'air	8°4	0,55

Fermentation sélective : 85 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

K. africana se distingue nettement de *K. apiculata* par la grosseur des cellules, par l'assimilation des sucres, par le pouvoir alcoogène beaucoup plus élevé et la formation d'acidité volatile plus faible et enfin par la capacité de faire fermenter le glucose beaucoup mieux que le fructose.

Kloeckera jensenii (Klöcker) Janke.

Sur le moût de raisin, au bout de 6 jours à 25°, les cellules ont des formes variées : apiculées, et elliptiques 10 × 5 à 3 × 2 μ et 8 × 6 μ. Le liquide au bout de 6 jours est à peu près limpide. Cette souche a été isolée à partir d'une petite colonie prélevée sur le moût au début de la fermentation. Nous avons observé la fermentation des glucose, saccharose et raffinose pour un tiers, le maltose et le galactose n'étant pas fermentés. Nous n'avons pu poursuivre l'étude de cette levure, car la souche a été perdue.

Torulopsis bacillaris (Kroemer et Krumbholz) Lodder.

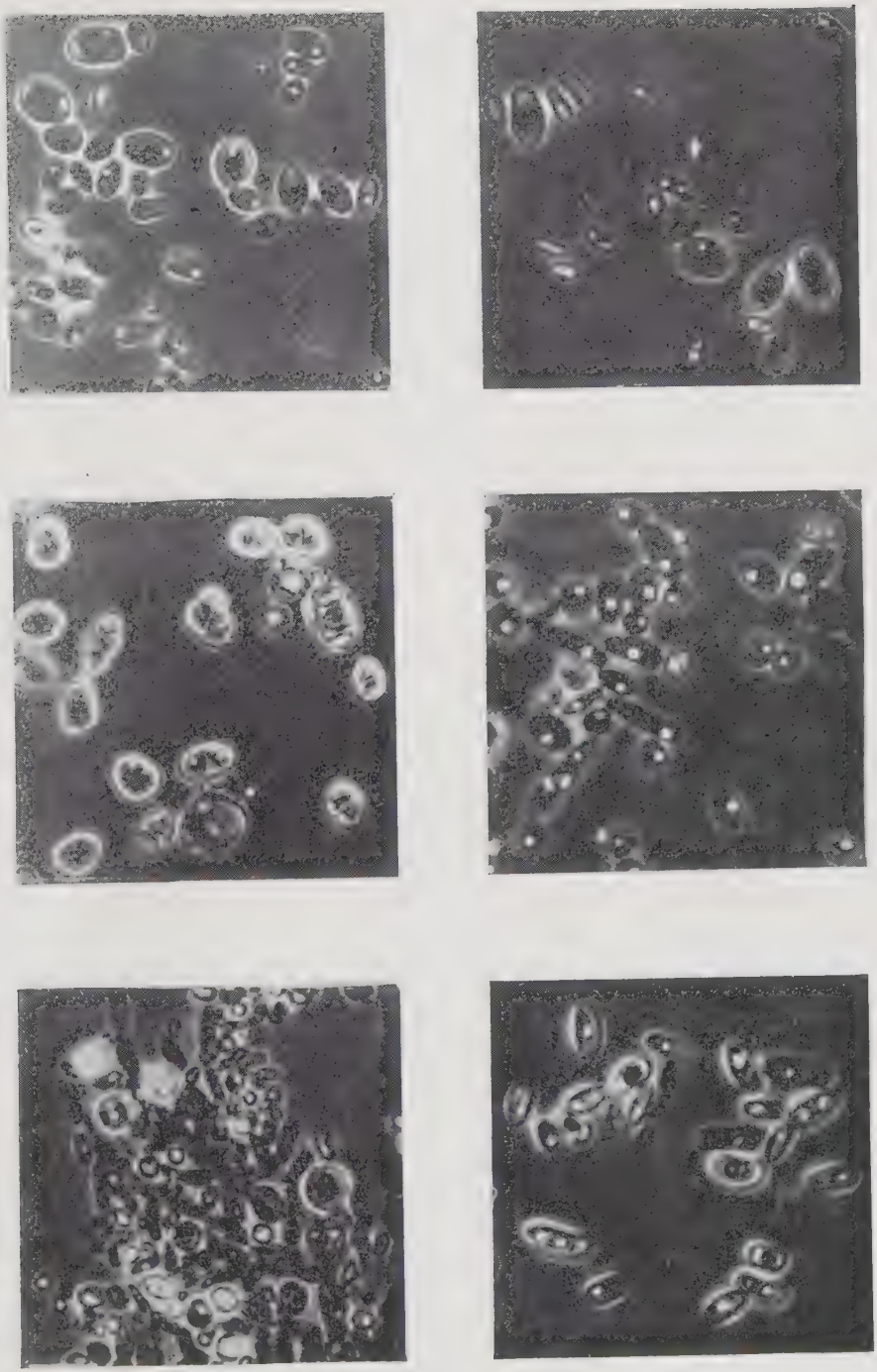
Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont elliptiques, un peu allongées, groupées par le bourgeonnement multipolaire autour de la cellule mère. 6 × 3 à 3 × 2 μ. Sur malt gélosé, les cellules sont très petites, le rapport longueur/largeur est voisin de 2. Sur moût de raisin, le liquide est limpide, la fermentation laisse de légères traces sur le tube. Sur moût gélatiné, les colonies sont en général petites et mates, en relief, en piton rose, ou dentelées ou blanches ou brillantes. Les colonies géantes sur moût de raisin gélatiné sont petites et minces, plus ou moins brunes et légèrement enfoncées dans la gélatine. Elles sont très caractéristiques.

Fermentation et assimilation des glucose, saccharose et raffinose pour un tiers ; les maltose et galactose ne fermentent pas et ne sont pas assimilés.

L'assimilation des nitrates et l'assimilation de l'éthanol sont nulles.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	5 III Premières Côtes		13 N Côtes de Montravel		14 J Graves	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile
Air	11°7	0,55	11°8	0,27	11°2	0,52
Abri de l'air	7°8	0,64	8°0	0,37	7°7	0,49



Photographies de cultures sur milieux solides G = 1 000.

De haut en bas et par colonnes : *Brettanomyces vini, Sacch. ellipsoideus, Pichia membranaefaciens. — Brettanomyces schanderlii, Hansenula anomala, Pichia fermentans.*

Fermentation sélective : 5 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Torulopsis famata (Harrison) Lodder et K-Van Rij.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont à peu près rondes 6 × 6 μ, 5 × 5 μ, 4 × 3 μ. Certaines ont un globule assez gros. Le liquide est limpide, un anneau blanc jaunâtre est formé en surface, le dépôt est marron. Sur malt gélosé, la culture est très légèrement rosée, très brillante. Les colonies géantes sur moût gélatiné sont rosées, mates. Parfois elles liquéfient la gélatine.

Fermentation du glucose seulement ; les glucose, maltose, saccharose et galactose sont assimilés. Un anneau et un dépôt de coloration rose sont formés sur les tubes d'assimilation.

L'assimilation des nitrates est nulle.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

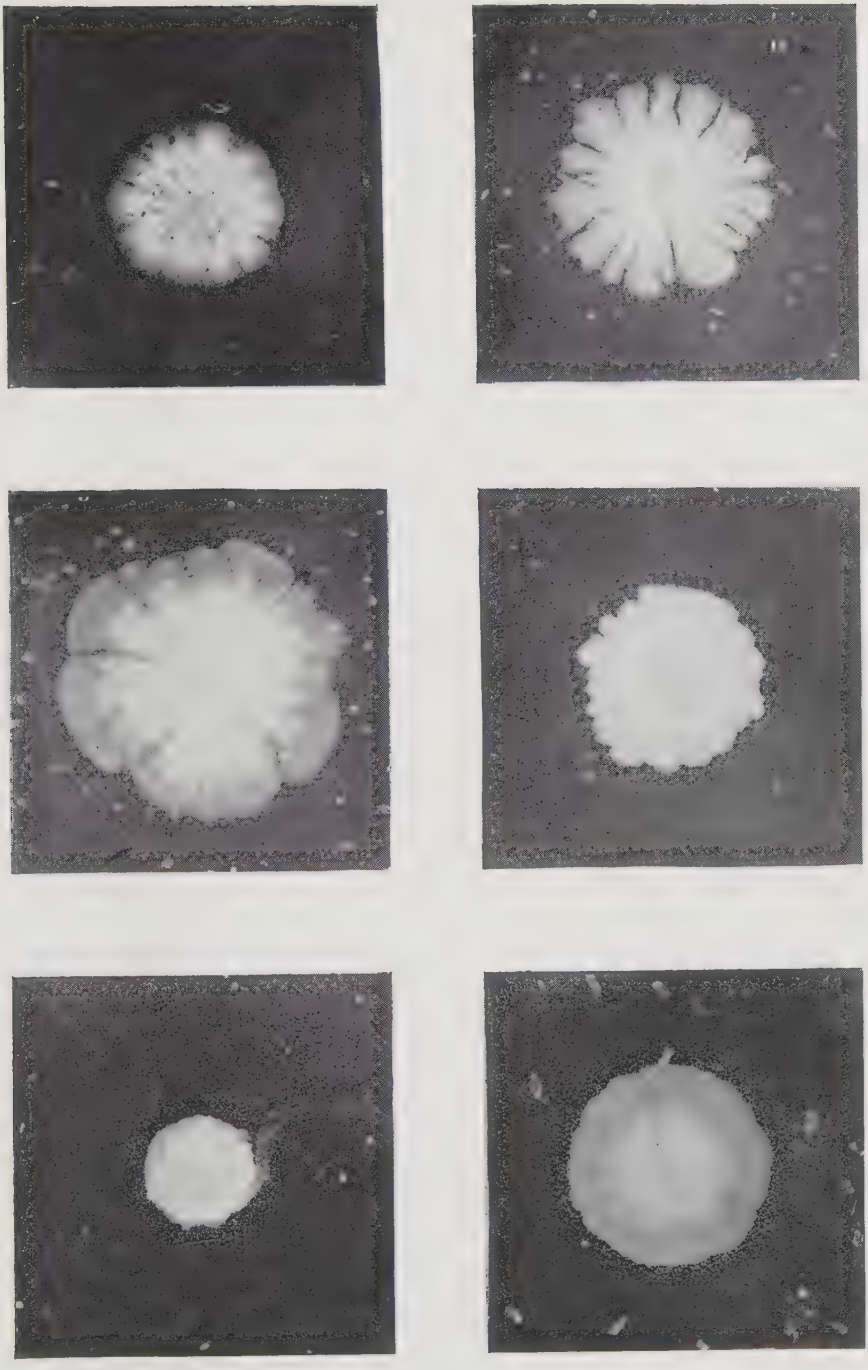
	II Médoc	
	Degré.	Acidité volatile.
	—	—
Air		0,12
Abri de l'air	2°1	0,09

Brettanomyces vini (nouvelle espèce).

Nous avons isolé quatre souches de levures que nous avons identifiées comme appartenant au genre *Brettanomyces*. Avec les deux souches que nous avons conservées, nous avons conduit une étude plus approfondie que pour les autres espèces et qui a fait l'objet d'une publication (83). Jusqu'à maintenant, en effet, les souches de *Brettanomyces* avaient été surtout isolées sur des bières (Claussen, Kufferath et Van Laer, Custers). Cependant Schanderl a rencontré plusieurs fois de telles levures dans des vins mousseux (98). Agostini dans un voile de vin acétifié (1) Barret, Bidan et André, au cours d'isolements sur des vins jaunes du Jura altérés, ont trouvé des levures appartenant au genre *Brettanomyces* (4). Enfin, tout récemment, Galzy et Rioux ont reconnu quelques souches de *Brettanomyces* parmi les levures formant des voiles de fleur à la surface des vins (44).

Dans l'étude précitée, nous avons comparé les souches isolées avec des souches de divers *Brettanomyces* : *Br. claussenii* et *Br. bruxellensis*, provenant du C. B. S. de Delft ; *Br. lambicus*, *Br. anomalus* et deux espèces de *Brettanomyces* isolées de vins mousseux, que nous devons au Pr Schanderl de Geisenheim ; enfin avec deux souches de vins d'Arbois, que nous devons à la Station de Technologie de Versailles.

Description. — Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, le liquide est très légèrement trouble, les cellules sont elliptiques, un peu allongées 6 × 3, 5 × 3 μ ou 8 × 3 à 5 × 3 μ suivant les souches. Au bout de 6 jours, le liquide est trouble. Un dépôt est formé au fond du tube. Les



Photographies de colonies géantes sur moût gélatiné.

De haut en bas et par colonnes : *Sacch. ellipsoideus, Sacch. carlsbergensis Brettanomyces vini.* — *Sacch. ellipsoïdeus, Sacch. elegans, Pichia membranaefaciens.*

cellules sont un peu plus grosses 8 × 4 à 5 × 3 μ ou 10 × 3 à 5 × 3 μ. Au bout de 30 jours, les cellules ont un aspect à peu près identique : elles sont isolées, ou groupées par deux, ou en petites chaînes ayant jusqu'à 5 éléments. Le liquide est limpide ; des dépôts sont formés sur le fond et les parois du tube. Une souche forme des anneaux importants, tandis que l'autre n'en forme pas ou peu.

Sur moût de bière, l'aspect des cellules au cours du développement est sensiblement le même : d'une façon générale, elles sont un peu plus arrondies 8 × 6 à 5 × 3 μ ou 10 × 5 à 6 × 3 μ. Entre le troisième et le sixième jour on note l'apparition de globules ronds dans les cellules qui restent isolées, mais plus souvent groupées par deux ou en courtes chaînes. On peut noter au bout de 3 jours un léger voile mat, puis la formation incomplète d'un anneau blanc ou beige au-dessus du liquide qui devient peu à peu limpide.

Sur moût de bière gélosé, au bout de 4 jours, la culture blanche, brillante, est formée de cellules elliptiques allongées 7 × 4, 5 × 3, 4 × 2 μ et de cellules très longues 12 × 4 μ ou même 20 × 3 μ. Au bout de 7 jours, les cellules elliptiques contiennent un granule et les longues cellules forment des chaînes ramifiées. Au bout de 31 jours, les cellules sont plutôt grosses et rondes 9 × 7 μ à 4 × 3 μ ou 12 × 5 μ avec beaucoup de cellules 8 × 7 à 5 × 3 μ.

Sur milieu de Gorodkowa, les cellules sont en moyenne plus petites que dans les milieux précédents. Les cultures sont minces, blanches, formées de colonies juxtaposées. Nous n'avons pas observé de spores.

Colonies géantes. — Sur moût de raisin gélatiné : colonies beiges, petites, rondes, mates ; centre plat ou légèrement creusé, bordure finement rayonnée, festons très petits. — Sur moût de bière gélosé : colonies blanches, brillantes, amorphes. — Sur moût de raisin gélosé : colonies blanches ou beige rosé, rondes sans festons, amorphes, brillantes.

Les deux souches cultivées en boîtes de Pétri sur moût gélatiné, liquéfient la gélatine. L'une d'elles ensemencée en profondeur, sur moût gélatiné, a laissé le milieu encore solide alors que l'autre avait déjà liquéfié la gélatine.

Fermentation et assimilation des glucose, maltose, saccharose, galactose. La fermentation et l'assimilation du galactose sont plus lentes que celles des autres sucres. Le raffinose et le lactose ne fermentent pas.

L'assimilation des nitrates est positive, tandis que l'assimilation de l'éthanol est nulle.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	Premières Côtes		Premières Côtes		Saint-Emilion	
	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.	Degré.	Acidité volatile.
Air.....	13°1	3,54	13°2	2,94	13°1	0,86
Abri de l'air ...	12°9	2,17	9°9	3,74	12°6	0,76

Fermentation sélective : 75 p. 100 du glucose pour 50 p. 100 du fructose.

Les pouvoirs alcoogènes sont assez élevés, les acidités volatiles sont très fortes, sauf pour la souche de Saint-Emilion. Les départs en fermentation étaient très lents, surtout au début ; peu à peu, ils ont été plus rapides, la levure s'est adaptée, semble-t-il, à fermenter plus rapidement le moût de raisin.

Les souches que nous avons isolées sont très voisines des deux souches d'Arbois et d'une des souches de *Brettanomyces* de Geisenheim. Elles n'appartiennent pas à l'espèce *bruxellensis* qui ne fait fermenter que le glucose, le maltose et le saccharose et n'assimile pas le galactose, ni les nitrates. Elles se rapprocheraient davantage de *Br. claussenii*, mais cette espèce fait fermenter le lactose.

Barret et ses collaborateurs (4) ont nommé cette levure *Br. bruxellensis* var. *vini* ; en réalité il y a entre *Br. bruxellensis* et cette levure beaucoup plus qu'une différence de variété. Ce sont des espèces nettement distinctes et pour exprimer cette différence, nous appelons cette espèce nouvelle, *Brettanomyces vini*.

Par ailleurs une autre souche de Geisenheim n'a rien de commun avec les précédentes et nous avons proposé de nommer cette nouvelle espèce, *Brettanomyces schanderlii* (83).

Depuis que ce travail a été fait, nous avons été amenés à identifier 3 souches provenant de la refermentation d'un vin clairet de Bordeaux, avec la souche *Brettanomyces schanderlii* : elles ont la même propriété de ne faire fermenter que le glucose et le galactose et présentent la même courbe de fermentation. Nous en traiterons en détail dans le chapitre VII.

Rhodotorula mucilaginosa Harrison.

Sur moût de raisin, au bout de 10 jours à 25°, il n'y a pas de fermentation, les cellules sont très clairsemées, petites et rondes 6×6 à $4 \times 3\,\mu$. Un anneau rose se forme. Sur malt gélosé, la culture humide est très brillante, lisse, de couleur rose vif ou orangé. Sur moût gélatiné, la colonie géante est petite, brillante, ronde, déprimée au centre avec un bourrelet au bord.

Aucune fermentation des sucres n'est observée. Les glucose, maltose, saccharose, galactose sont assimilés. On ne constate pas d'assimilation des nitrates.

Candida pulcherrima (Lindner) Windisch.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25° les cellules sont elliptiques, de grosseur moyenne, assez régulières, non transparentes. $8 \times 7\,\mu$, $5 \times 4\,\mu$, $4 \times 3\,\mu$. Au bout de 21 jours, les cellules ont 3×2, $4 \times 3\,\mu$. Sur malt gélosé, on n'observe pas de spores, mais des cellules très petites ou bien, beaucoup plus grosses avec un granule brillant (« pulcherrima »).

Sur moût de raisin, le liquide de culture est limpide ; parfois, il y a formation d'un anneau.

Sur malt gélosé, la culture forme une pâte lisse, humide, de couleur crème. La colonie géante sur moût gélatiné est assez grosse, blanche. Elle liquéfie un peu la gélatine.

Fermentation du glucose seulement. Les maltose, saccharose et galactose sont assimilés.

L'assimilation des nitrates est nulle. On note un faible développement sur l'éthanol.

Pouvoir alcoogène et formation d'acidité volatile :

	II Saint-Emilion	
	Degré.	Acidité volatile.
	—	—
Air	—	0,06
Abri de l'air	2°4	0,06

Candida mycoderma (Reess) Lodder et K-Van Rij.

Sur moût de raisin, au bout de 3 jours à 25°, les cellules sont elliptiques ou allongées en bâtonnets 10 × 2 à 6 × 2 μ. Le liquide est trouble, un voile blanc, remontant, plissé est formé, parfois il est ténu ; un volumineux dépôt se rassemble au fond du tube. Sur malt gélosé, la culture peut être lisse, assez brillante, remontant en arborescences, ou mate et granulée, blanche ou brune, ou blanc jaunâtre, mate et brillante suivant les endroits. On n'observe pas de spores. Sur moût gélatiné, la colonie est petite, blanche, mate. La colonie géante sur moût gélatiné est très étendue et liquéfie la gélatine. Elle peut être mate, de couleur normale, peu découpée, mais avec des secteurs vermiculés.

Aucun pouvoir fermentatif. Seul le glucose est assimilé. L'assimilation des nitrates est nulle et on constate un développement net sur milieu à l'éthanol.

CHAPITRE IV

LEVURES DES RÉGIONS DE VINS ROUGES

I. — RÉGION DU MÉDOC

Dans la région bien délimitée du Médoc, dont les vins forment un ensemble homogène, nous avons prélevé 25 moûts au cours des vendanges des années 1951 et 1952 ; ces moûts provenaient de 22 propriétés classées d'après la hiérarchie commerciale, des premiers crus aux cinquièmes crus, et des crus bourgeois aux vins de Palus (terrains d'alluvions de la Gironde).

Nous avons ainsi obtenu 473 souches de microorganismes, soit en moyenne une vingtaine par vignoble, mais parmi ces souches, 35 appartenant vraisemblablement à l'espèce *Candida mycoderma* se sont montrées incapables de faire fermenter le moût de raisin. Nous n'indiquerons que la répartition des levures qui ont une activité fermentative, soit 438 souches.

Ces travaux sur les levures du Médoc ont fait l'objet en 1953 d'une publication de prise de date (79) et nous ne reviendrons pas sur le détail des résultats obtenus. Nous donnons dans le tableau I la répartition des espèces de levures isolées par cru ; le tableau récapitulatif II a été légèrement modifié, car le classement de quelques souches a été reconsidéré. Il précise la répartition entre les 5 genres, trois genres non sporogènes et deux genres sporogènes, et les 14 espèces, des 438 levures fermentatives isolées.

Afin d'avoir une idée du rôle joué par chaque espèce dans la fermentation, nous avons calculé sa fréquence parmi les souches isolées et le nombre et le pourcentage des moûts contenant ces espèces. Ces chiffres n'ont évidemment qu'une valeur relative mais restent significatifs. Ainsi, nous avons obtenu 254 souches de *K. apiculata* sur 438 souches isolées, soit 58 p. 100 de la totalité et 135 souches de *Sacch. ellipsoïdeus* soit 30,8 p. 100. Cela ne prouve pas, bien entendu, que la fermentation des vins du Médoc soit conduite surtout par *K. apiculata* ; en réalité, nous nous sommes placés dans les conditions où l'on rencontre surtout ces levures. En effet, d'une part notre échantillonnage a été effectué sur les raisins et d'autre part, nous avons prélevé un plus grand nombre de colo-

nies au début de la fermentation qu'à la fin ; le nombre de *Saccharomyces ellipsoïdeus* prenant part à la fermentation a donc été, de ce fait, limité.

La fréquence de chaque espèce dans les 25 moûts donne une indication sur son importance géographique. Ainsi, nous avons trouvé *K. apiculata* dans tous les moûts étudiés et *Sacch. ellipsoïdeus* dans 24 sur 25. Ces deux espèces étant les plus communes, les plus répandues, jouent certainement le rôle le plus important. Par comparaison, *Sacch. oviformis* que nous avons trouvé dans 12 p. 100 des moûts et *Sacch. steineri* dans 8 p. 100 des moûts, paraissent n'être que des levures secondaires. Toutefois, il ne faut pas négliger leur action, ni supposer totalement absentes les levures que nous n'avons pas observées, le nombre des colonies prélevées étant faible.

TABLEAU I

Répartition par cru des espèces de levures isolées (Médoc).

N° du cru	Classification et origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
1	1er cru, Pauillac.....	1951	24	13 *K. apiculata.*	4°6	0,88
				8 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,05
				2 *Sacch. carlsbergensis.*	8°9	0,86
				1 *Sacch. chevalieri.*	12°9	1,09
		1952	18	2 *K. apiculata.*	4°6	0,97
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°3	1,07
2	2e cru, Pauillac.....	1951	20	15 *K. apiculata.*	5°1	1,03
				4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°6	1,22
				1 *Sacch. oviformis.*	12°7	1,38
3	2e cru, Saint-Julien ...	1951	19	14 *K. apiculata.*	3°8	0,92
				5 *Sacch. florentinus.*	8°2	0,60
4	2e cru, Saint-Julien ...	1952	17	11 *K. apiculata.*	4°3	0,97
				3 *Sacch. chevalieri.*	12°1	1,40
				1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°6	1,28
				2 *P. fermentans.*	7°0	0,62
5	2e cru, Margaux	1951	15	10 *K. apiculata.*	5°0	0,98
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,27
6	2e cru, Cantenac	1952	23	11 *K. apiculata.*	4°9	1,15
				7 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°5	1,19
				5 *Sacch. fructuum.*	12°7	1,09
7	3e cru, Cantenac	1951	17	12 *K. apiculata.*	5°0	0,75
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°2	1,08
		1952	17	5 *K. apiculata.*	4°6	1,30
				6 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°2	1,10
				6 *T. bacillaris.*	7°7	0,68
8	3e cru, Saint-Estèphe ..	1951	18	13 *K. apiculata.*	4°8	1,73
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°7	1,25
9	3e cru, Labarde	1952	18	12 *K. apiculata.*	4°5	1,33
				6 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°3	1,00
10	4e cru, Saint-Julien ...	1951	19	14 *K. apiculata.*	4°0	1,68
				3 *Sacch. ellipso deus.*	12°8	1,38
				2 *Sacch. chevalieri.*	13°1	1,15
		1952	21	9 *K. apiculata.*	5°0	1,20
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°2	1,00
11	5e cru, Pauillac	1951	13	7 *K. apiculata.*	4°2	1,27
				1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°7	1,00
				5 *T. famata .*	2°3	0,06

TABLEAU I *(suite)*

N° du cru	Classification et origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
12	5e cru, Pauillac	1951	14	1 *K. apiculata.*	4°2	0,87
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°2	0,98
				1 *Sacch. steineri.*	13°4	0,88
13	5e cru, Pauillac	1951	17	12 *K. apiculata.*	3°3	0,91
				4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,18
				1 *Sacch. steineri.*	14°0	1,32
14	5e cru, Macau	1951	15	10 *K. apiculata.*	4°3	0,97
				3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°7	1,05
				2 *Sacch. bayanus.*	12°6	1,26
15	Cru bourgeois supérieur, Saint-Estèphe	1951	18	9 *K. apiculata.*	4°9	0,80
				4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°3	1,37
				1 *Sacch. oviformis.*	13°4	1,46
				4 *Rh. mucilaginosa.*	—	—
16	Cru bourgeois supérieur, Cussac.....	1951	18	13 *K. apiculata.*	3°7	1,20
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°7	1,31
17	Cru bourgeois supérieur, Soussans	1951	16	11 *K. apiculata.*	3°7	1,39
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°2	1,34
18	Cru bourgeois supérieur, Moulis	1951	16	11 *K. apiculata.*	4°3	2,06
				1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°9	1,08
				4 *Sacch. uvarum.*	7°8	0,80
19	Cru bourgeois, Cissac ..	1951	19	14 *K. apiculata.*	3°8	0,96
				4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°6	1,36
				1 *Sacch. oviformis.*	12°5	1,54
20	Cru bourgeois, Cissac ..	1951	17	12 *K. apiculata.*	3°9	1,11
				2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°9	1,14
				1 *Sacch. chevalieri.*	13°2	1,40
				1 *Sacch. bayanus.*	12°8	1,50
				1 *Sacch. uvarum.*	9°3	0,86
21	Cru bourgeois, Cussac .	1951	14	3 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°2	1,09
22	Palus, Labarde	1951	15	10 *K. apiculata.*	4°0	1,16
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°9	1,23

TABLEAU II

Tableau récapitulatif des espèces de levures des vins du Médoc.

438 souches isolées de 25 moûts.

	Nombre de souches	Fréquence p. 1000 souches	Nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Kloeckera apiculata	254	579,8	25	100
Torulopsis bacillaris	6	13,7	1	4
Torulopsis famata	5	11,5	1	4
Rhodotorula mucilaginosa	4	9,1	1	4
Saccharomyces ellipsoïdeus	135	308,0	24	96
Saccharomyces oviformis	3	6,8	3	12
Saccharomyces bayanus	3	6,8	2	8
Saccharomyces chevalieri	7	16,0	4	16
Saccharomyces fructuum	5	11,5	1	4
Saccharomyces carlsbergensis	2	4,6	1	4
Saccharomyces uvarum	5	11,5	2	8
Saccharomyces florentinus	5	11,5	1	4
Saccharomyces steineri	2	4,6	2	8
Pichia fermentans	2	4,6	1	4

Tableau III

Répartition des levures du Médoc d'après leur pouvoir alcoogène.

	1° -2°	2° -3°	3° -4°	4° -5°	5° -6°	6° -7°	7° -8°	8° -9°	9° -10°	10° -11°	11° -12°	12° -13°	13° -14°	14° -15°	15° -16°	16° -17°	Totaux
Kloeckera apiculata		3	74	114	58												249
Torulopsis bacillaris							5	1									6
Torulopsis famata	1	4															5
Sacch. ellipsoïdeus								2	5	15	35	32	32	7	4	2	134
Sacch. oviformis												3					3
Sacch. bayanus													3				3
Sacch. chevalieri										1	2	2	2				7
Sacch. fructuum										1	1	3					5
Sacch. carlsbergensis										1			1				2
Sacch. uvarum							2	2	1								5
Sacch. florentinus									2	3							5
Sacch. steineri													1	1			2
Pichia fermentans					1	1											2
Totaux	1	7	74	114	59	1	7	5	8	21	38	40	39	8	4	2	428

Nous avons trouvé dans certains moûts 3, 4, et même pour l'un d'eux, 5 espèces de levures différentes. Qualitativement la microflore est donc excessivement variée, d'autant plus que, comme il a été dit, nous n'en avons ici qu'une image incomplète. Tous les vins sans exception résultent de fermentations associées. 10 moûts sur 25 donnent l'exemple de l'association classique *K. apiculata* — *Sacch. ellipsoïdeus*. Mais dans d'autres les levures d'appoint apparaissent presque aussi nombreuses, et exceptionnellement même, plus nombreuses, que *Sacch. ellipsoïdeus*.

Le pouvoir alcoogène des levures du Médoc est compris entre 1° et 17°. Ce sont bien entendu, les levures sporogènes qui sont capables de donner le plus d'alcool. *K apiculata* forme, suivant les souches, de 2° à 6° et *Sacch. ellipsoïdeus* de 8° à 17°, mais le plus grand nombre des souches de cette dernière espèce se place entre 10° et 14°.

Les degrés atteints par les autres *Saccharomyces* (*chevalieri*, *fructuum*, *bayanus*, *steineri*) se placent également entre 11° et 14°, à part *Sacch. uvarum* dont le pouvoir alcoogène est nettement plus faible et se situe entre 7° et 10°. En général, les levures du Médoc présentent, par rapport à celles d'autres régions de la Gironde, des pouvoirs alcoogènes moins élevés. Cela peut expliquer les difficultés de vinification qu'on rencontre en Médoc les années où les raisins sont très riches en sucre.

Les acidités volatiles formées par ces levures, reproduites dans le tableau I, sont beaucoup plus élevées que celles qui sont habituellement observées dans la pratique de la vinification. Il en sera toujours de même au cours de ce travail. Cette différence est due à la grande richesse en sucre du moût d'expérience, et aussi au fait que la production d'acidité volatile est plus élevée dans les moûts pasteurisés et surtout autoclavés. Ces chiffres d'acidité volatile doivent être considérés pour leur valeur comparative et non pour leur intérêt œnologique.

En comparant les levures d'une même espèce issues des divers crus du Médoc, nous avons observé de grandes différences, notamment dans le pouvoir alcoogène, la production d'acidité volatile et l'aspect des colonies géantes. Les variations de ces trois caractères ne sont pas conjuguées, mais nous pensons qu'elles mettent en évidence l'existence de races différentes à l'intérieur de chaque espèce : ainsi, en observant les colonies géantes de 105 souches de *Sacch. ellipsoïdeus*, nous avons reconnu 66 types différents ; 10 sont communs à des *Sacch. ellipsoïdeus* prélevés en divers endroits du Médoc, mais 56 correspondent à 56 souches différentes isolées chacune dans un seul cru. Nous ne donnerons pas ici le détail de nos observations sur la présence de races différentes d'une même espèce, dans un même cru et d'un cru à un autre, car elles ont déjà fait l'objet d'une publication (79).

II. — RÉGIONS DU LIBOURNAIS, DES GRAVES ET DES PREMIÈRES CÔTES

Nous étudierons dans cette partie les levures prélevées en 1952 et 1953 dans les régions de vins rouges du Libournais (appellations Saint-Emilion, Pomerol, Puisseguin-Saint-Emilion, Montagne-Saint-Emilion), des Premières Côtes de Bordeaux sur la rive droite de la Garonne, et des Graves sur la rive gauche. Nous avons échantillonné 28 moûts dans la première région, trois dans la seconde et deux dans la troisième. Nous avons obtenu ainsi 650 microorganismes, comprenant 632 souches fermentatives qui nous ont été fournies par 33 moûts au total, à raison d'une vingtaine de souches par moût, comme dans le Médoc.

Les tableaux IV, V et VI indiquent la répartition par cru des levures

TABLEAU IV

Répartition par cru des espèces de levures isolées
(Appellation Saint-Emilion).

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
1	Château A, Saint-Émilion	1952	18	6 *K. apiculata.*	4°7	1,09
				10 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°5	1,53
				1 *Sacch. oviformis.*	14°4	1,71
				1 *Sacch. chevalieri.*	12°0	1,65
2	Château B, Saint-Émilion	1952	24	7 *K. apiculata.*	4°8	1,37
				4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°0	1,59
				13 *Sacch. chevalieri.*	12°9	1,70
3	Château C, Saint-Émilion	1953	24	5 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°8	1,39
				3 *Sacch. oviformis.*	15°9	1,01
				2 *Sacch. chevalieri.*	14°6	1,10
				1 *Brettanomyces vini.*	13°1	0,86
4	Château C. B., Saint-Émilion	1952	11	8 *K. apiculata.*	4°7	1,32
				3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	10°9	1,41
5	Château C. F., Saint-Émilion	1952	24	9 *K. apiculata.*	4°8	1,17
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°7	1,59
				1 *Sacch. fructuum.*	10°8	1,41
6	Château Cr, Saint-Émilion	1953	18	5 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,41
				1 *Sacch. chevalieri.*	11°9	1,53
				1 *Sacch. steineri.*	14°2	1,35
7	Château F, Saint-Emilion	1952	15	8 *K. apiculata.*	5°4	1,06
				6 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,65
				1 *P. membranaefaciens.*	2°3	0,30
8	Château G. P., Saint-Émilion	1952	24	6 *K. apiculata.*	4°9	1,01
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°8	1,53
				1 *P. membranaefaciens.*	3°0	0,86
				1 *Candida pulcherrima.*	—	—

TABLEAU IV *(suite)*

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
9	Château G. N., Saint-Émilion	1952	16	2 *K. apiculata.*	4°7	1,10
				10 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°0	1,35
				1 *Sacch. chevalieri.*	17°1	1,65
				3 *T. rosei.*	6°8	0,16
10	Château L, Saint-Émilion	1952	24	9 *K. apiculata.*	4°2	1,16
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°5	1,53
11	Château M, Saint-Sulpice-de-Faleyrens	1952	23	1 *K. apiculata.*	4°3	1,01
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°1	1,41
				1 *T. rosei.*	6°0	0,12
				5 *Candida pulcherrima.*	1°8	0,09
12	Château P. D., Saint-Émilion	1952	16	4 *K. apiculata.*	4°4	1,12
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	10°8	1,35
13	Château Pe, Saint-Émilion	1952	24	6 *K. apiculata.*	5°2	1,03
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°1	1,53
				3 *Sacch. chevalieri.*	11°7	1,35
14	Château R, Saint-Émilion	1953	22	4 *K. apiculata.*	—	—
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°8	1,56
				1 *Sacch. chevalieri.*	12°6	1,77
				2 *Debaryomyces hanseniі.*	—	—
15	Château S, Saint-Émilion	1952	24	10 *K. apiculata.*	4°8	1,12
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,53
				2 *Sacch. chevalieri.*	12°7	1,28
16	Château V. G., Saint-Étienne-de-Lisse.....	1952	24	2 *K. apiculata.*	4°3	0,93
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°3	1,41
				3 *Sacch. oviformis.*	13°7	1,59
				3 *Sacch. chevalieri.*	12°9	1,44
				3 *T. rosei.*	7°0	0,32

isolées dans les trois régions énumérées. Nous avons groupé les crus par appellation : 16 pour « Saint-Émilion », 12 pour « Pomerol », « Puisseguin Saint-Émilion » et « Montagne-Saint-Émilion », 5 pour « Graves » et « Premières Côtes ». Le nombre d'espèces isolées dans chaque cru est assez variable : il peut aller de un à sept mais dans les conditions où nous avons opéré, nous avons rencontré le plus souvent de deux à quatre espèces dans chaque moût.

Nous avons isolé 18 espèces de levures différentes dont le tableau VII donne la liste. Les 632 souches fermentatives appartiennent à quatre genres non sporogènes et cinq genres sporogènes. Cette plus grande variété par rapport à celle observée dans la région du Médoc, provient sans doute en partie de la méthode de prélèvement employée. Ici encore la récolte des échantillons a été faite surtout sous forme de raisins, mais les souches ont été isolées pendant le cours de la fermentation et non pas seulement dans le moût initial et dans le liquide obtenu après fermentation.

Tableau V

Répartition par cru des espèces de levures isolées (Appellations Pomerol, Puisseguin-Saint-Emilion et Montagne Saint-Emilion).

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
17	Château S. G., Montagne	1952	6	6 *Sacch. ellipsoïdeus.*	10°4	1,77
18	Château C, Pomerol ...	1953	24	4 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°6	1,52
				2 *Sacch. chevalieri.*	11°5	1,68
				1 *T. bacillaris.*	11°9	0,49
				1 *P. fermentans.*	13°0	0
19	Château E, Pomerol ...	1952	12	10 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°5	1,54
				2 *Sacch. oviformis.*	11°7	1,83
20	Château En, Pomerol..	1952	20	9 *K. apiculata*	5°1	0,94
				5 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°0	1,50
				6 *H. anomala.*	5°2	0,60
21	Château M, Pomerol ..	1952	4	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,53
				3 *Sacch. chevalieri.*	14°8	1,77
22	Château N, Pomerol...	1952	12	8 *K. apiculata.*	5°4	0,77
				2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	10°0	1,59
				2 *T. rosei.*	6°3	0,15
23	Château P. V., Pomerol	1952	24	6 *K. apiculata.*	4°4	1,19
				17 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,83
				1 *Sacch. chevalieri.*	13°6	1,53
24	Château P, Pomerol ...	1952	12	6 *K. apiculata.*	4°2	1,35
				6 *Sacch. ellipsoïdeus.*	9°8	1,47
25	Château B. A., Puisseguin	1953	20	4 *K. apiculata.*	—	—
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°9	1,41
				2 *Debaryomyces hansenii.*		
26	Domaine D. L., Puisseguin	1953	35	3 *K. apiculata.*	—	—
				18 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°9	1,41
				1 *Sacch. oviformis.*	11°9	0,03
				11 *T. rosei.*	11°8	1,32
				1 *H. anomala.*	4°1	0,61
				1 *K. jensenii.*	—	—
27	C. C., Puisseguin	1953	20	2 *K. apiculata.*	—	—
				18 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,48
28	Château G. L., Puisseguin	1953	21	3 *K. apiculata.*	—	—
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°4	1,48
				1 *Sacch. oviformis.*	13°5	1,16
				1 *Sacch. chevalieri.*	15°6	1,28
				1 *T. rosei.*	11°7	0,03

D'après les chiffres du tableau VII, l'espèce prépondérante est *Sacch. ellipsoïdeus* qui groupe 58 p. 100 des souches prélevées, tandis que *K. apiculata* vient en second rang avec 25 p. 100 de la population totale. Cette proportion est à peu près l'inverse de celle que nous avions observée dans la région du Médoc ; mais il faut considérer que nous avons volontairement limité le nombre de souches prélevées au début de la fermentation, et par conséquent, de *K. apiculata*. En effet, en considérant la fréquence de ces deux espèces dans les moûts, nous constatons qu'elles sont associées dans 30 cas sur 33. Lorsque *K. apiculata* fait parfois défaut,

TABLEAU VI

Répartition par cru des espèces de levures isolées
(Appellations Graves, Premières Côtes).

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
29	Château H, Pessac	1953	17	4 *K. apiculata.*	—	—
				7 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°1	1,35
				1 *Sacch. chevalieri.*	14°2	1,28
				1 *Sacch. uvarum.*	15°7	0,61
				1 *Sacch. carlsbergensis.*	13°0	1,62
				2 *Sacch. steineri.*	14°8	1,44
				1 *T. bacillaris.*	11°3	0,61
30	Château P, Pessac	1953	14	2 *K. apiculata.*	—	—
				8 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,63
				3 *T. bacillaris.*	11°1	0,48
				1 *Debaryomyces hansenii.*	—	—
31	Cambes, Premières Côtes	1953	15	3 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°4	1,32
				1 *K. africana.*	10°3	0,40
32	Camblanes, Premières Côtes	1953	21	3 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,45
				1 *Sacch. oviformis.*	14°0	1,22
				1 *T. bacillaris.*	10°7	0,61
33	Quinsac, Premières Côtes	1953	24	6 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°4	1,32
				3 *Sacch. oviformis.*	15°7	0,69
				1 *T. rosei.*	13°0	0,06
				3 *Brettanomyces vini.*	12°7	3,51

alors que *Sacch. ellipsoïdeus* est présent dans tous les moûts, c'est que l'échantillon prélevé était déjà en pleine fermentation.

Sacch. chevalieri domine un groupe de levures assez courantes qu'il constitue avec *Sacch. oviformis* et *Torulaspora rosei*. Cette importance est en accord avec la fréquence géographique de ces espèces que l'on trouve dans 20 à 40 p. 100 des moûts. Un troisième groupe renferme les espèces qui n'apparaissent que dans un petit nombre de moûts. Parmi celles-ci, nous rangeons une souche de *K. africana* et une souche de *K. jensenii*, ainsi que quatre souches de *Brettanomyces* qui proviennent, l'une de Saint-Emilion, les autres de Quinsac : la présence de cette dernière espèce n'est donc pas simplement un cas unique. Nous avons exposé dans le chapitre III les raisons pour lesquelles nous avons donné à ces souches le nom de *Brettanomyces vini*. Il est nécessaire de souligner que la présence de *Brettanomyces* dans les vins a été assez rarement observée (1, 4, 44, 83, 98). Nous avons aussi trouvé *Hansenula anomala*, *Pichia fermentans* et *Pichia membranaefaciens*.

Dans le tableau VIII nous avons classé 576 souches d'après leur pouvoir alcoogène qui s'échelonne de 1° à 19°, lorsque ces levures sont essayées sur un moût suffisamment riche en sucre.

Comme dans la région du Médoc, *K. apiculata* forme de 3 à 6° d'alcool,

tandis que la souche de *K. africana* a un pouvoir alcoogène beaucoup plus élevé et atteint 10°.

Les levures qui forment le moins d'alcool sont *Candida pulcherrima*, *Pichia membranaefaciens*, puis *Hansenula anomala*. Ces dernières espèces forment des voiles superficiels et produisent beaucoup d'esters. La formation d'alcool par *Torulaspora rosei* varie entre 6° et 13°.

Le groupe des *Saccharomyces* est naturellement le plus alcoogène : il produit de 8° à 19°. 98,5 p. 100 des *Sacch. ellipsoïdeus* forment de 10° à 17° ; les autres *Saccharomyces* se placent de même dans cette zone.

D'une façon générale, les levures des régions du Libournais, des Graves et des Premières Côtes sont assez fortement alcoogènes puisque 75 p. 100 de celles que nous avons isolées forment plus de 10°.

Il existe de notables différences entre les espèces prélevées au début et à la fin de la fermentation : les deux prélèvements effectués sur les échantillons du Médoc nous l'avaient montré, en 1951. Aussi les années suivantes, avons-nous effectué plusieurs prélèvements sur le moût conservé à la température du laboratoire : au bout d'un jour, au bout de quatre ou de huit jours, au bout d'un mois et de deux mois ; parfois il nous a été possible de prélever parallèlement du moût fermentant en cuve dans les conditions de la pratique. Bien que chaque moût n'ait pu toujours être suivi régulièrement et que les divers prélèvements varient d'importance, l'ensemble des résultats permet de tirer des conclusions intéressantes. Pour rendre la lecture du tableau IX plus facile, nous avons

TABLEAU VII

Tableau récapitulatif des espèces de levures des vins rouges du Libournais, des Graves et des Premières Côtes.

632 souches isolées de 33 moûts.

	Nombre de souches	Fréquence p. 1000 souches	Nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Kloeckera apiculata	155	245,1	30	91
Kloeckera africana	1	1,6	1	3
Kloeckera jensenii	1	1,6	1	3
Torulopsis bacillaris	6	9,5	4	12
Brettanomyces vini	4	6,3	2	6
Candida pulcherrima	6	9,5	2	6
Saccharomyces ellipsoïdeus	366	579,1	33	100
Saccharomyces oviformis	15	23,7	8	24
Saccharomyces chevalieri	35	55,4	14	42
Saccharomyces fructuum	1	1,6	1	3
Saccharomyces carlsbergensis	1	1,6	1	3
Saccharomyces uvarum	1	1,6	1	3
Saccharomyces steineri	3	4,8	2	6
Torulaspora rosei	22	34,8	7	21
Hansenula anomala	7	11,1	2	6
Pichia fermentans	1	1,6	1	3
Pichia membranaefaciens	2	3,2	2	6
Debaryomyces hansenii	5	7,9	3	9

Tableau VIII

Répartition des levures du Libournais, des Graves et des Premières Côtes rouges d'après leur pouvoir alcoogène

	1° — 2°	2° — 3°	3° — 4°	4° — 5°	5° — 6°	6° — 7°	7° — 8°	8° — 9°	9° — 10°	10° — 11°	11° — 12°	12° — 13°	13° — 14°	14° — 15°	15° — 16°	16° — 17°	17° — 18°	18° — 19°	Totaux
K. apiculata			8	62	37														107
K. africana										1									1
T. bacillaris										2	4								6
Brett. vini											1		3						4
C. pulcherrima	3	3																	6
Sacch. ellipsoïdeus								2	7	33	50	54	71	69	59	16	4	1	366
Sacch. oviformis											3		1	5	3	1			13
Sacch. chevalieri											10	9	6	6	2	1	1		35
Sacch. fructuum													1						1
Sacch. carlsbergensis													1						1
Sacch. uvarum															1				1
Sacch. steineri													1	2					3
Torulaspora rosei						6	3	1		2	4	6							22
Hansenula anomala				4	2	1													7
P. fermentans													1						1
P. membranaefaciens		1	1																2
Totaux	3	4	9	66	39	7	3	3	7	38	72	69	85	82	65	18	5	1	576

TABLEAU IX

Succession des espèces de levures au cours de la fermentation.

Régions de vins rouges.

Les chiffres indiquent le pourcentage de fréquence pour chaque prélèvement.

	Avant fermentation 461 souches	Demi-fermentation 177 souches	Fin de la fermentation 233 souches
Kloeckera apiculata	78,7	19,2	0
Kloeckera africana	0	0,6	0
Kloeckera jensenii	0,2	0	0
Torulopsis bacillaris	1,3	3,4	0
Torulopsis famata	1,1	0	0
Brettanomyces vini	0	2,2	0
Candida pulcherrima	1,3	0	0
Rhodotorula mucilaginosa	1,0	0	0
Total des levures non sporogènes	*83,6*	*25,4*	*0*
Saccharomyces ellipsoïdeus	13,0	62,2	73,8
Saccharomyces oviformis	0,2	0,6	6,0
Saccharomyces chevalieri	0,4	6,2	7,7
Saccharomyces bayanus	0	0	1,3
Saccharomyces fructuum	0	0	1,3
Saccharomyces carlsbergensis	0,4	0	0,4
Saccharomyces uvarum	0	0	2,6
Saccharomyces florentinus	0	0	2,1
Saccharomyces steineri	0,2	1,1	0,9
Torulaspora rosei	2,2	0	0,4
Hansenula anomala	0	2,3	1,3
Pichia fermentans	0	0	1,3
Pichia membranaefaciens	0	0,6	0
Debaryomyces hansenii	0	1,7	0,9
Total des levures sporogènes	*16,4*	*74,7*	*100*

groupé les prélèvements effectués dans toutes les régions de vins rouges, en distinguant seulement trois périodes : avant le départ de la fermentation : 461 souches ; à la demi-fermentation : 177 souches ; et à la fin de la fermentation : 233 souches.

On remarque que 79 p. 100 des souches isolées avant la fermentation sont des *K. apiculata,* la proportion diminue par la suite et après avoir été de 19 p. 100 seulement au milieu de la fermentation, on n'en trouve plus au bout d'un mois. *Sacch. ellipsoïdeus* suit l'évolution inverse : de 13 p. 100 du prélèvement effectué avant fermentation, la proportion passe à 62 p. 100 au milieu et à 74 p. 100 à la fin de la fermentation. Les autres espèces sont plus rares, mais on peut noter quelques caractères remarquables : *Sacch. oviformis, Sacch. bayanus, Sacch. fructuum, Sacch, uvarum, Sacch. florentinus, P. fermentans* sont surtout des levures de fin de fermentation ; *Sacch. chevalieri,* et *Sacch. steineri* apparaissent plus tôt, ainsi que *H. anomala,* tandis que *K. jensenii, T. famata, C. pulcherrima* et *Rh. mucilaginosa* ont été trouvées uniquement dans les premiers jours. *T. bacillaris* a une action plus prolongée et persiste plus longtemps dans le moût, quant à *K. africana* et *Br. vini,* ces deux espèces ont été trouvées pendant la pleine fermentation.

D'une façon générale, les espèces non sporogènes sont nombreuses au début de la fermentation, alors que les espèces sporogènes présentent leur maximum d'activité vers la fin de ce phénomène.

En résumé, nous avons isolé sur les moûts prélevés un nombre assez élevé d'espèces de levures : on peut dire que la microflore des régions de vins rouges est extrêmement variée. Mais il y a apparemment peu de différences entre les divers crus : on observe partout l'association *K. apiculata-Sacch. ellipsoïdeus* qui est la base de la microflore du moût ; quelques espèces sont assez courantes enfin d'autres n'apparaissent que dans un petit nombre de cas. Le pouvoir alcoogène des levures apporte une nouvelle échelle de classification. On observe qu'il est généralement plus élevé dans les régions du Libournais, des Graves et Premières Côtes que dans le Médoc. La succession des espèces au cours de la fermentation apporte la confirmation de l'importance des espèces sporogènes. En fait ce sont elles qui font le vin, car leur action est la plus prolongée et ce sont aussi les plus alcoogènes.

Chapitre V

LEVURES DES RÉGIONS DE VINS BLANCS

La région bordelaise produit des vins blancs qu'on peut classer en deux types différents, bien que cette distinction par région de production n'ait rien d'absolu. Les uns sont secs ou peu sucrés ; ils proviennent de raisins non pourris ou peu pourris. Ils correspondent plus particulièrement, pour les régions que nous avons étudiées, aux appellations « Graves », «Entre-deux-Mers », « Graves de Vayres », « Bordeaux-Sainte-Foy » et « Côtes de Montravel », cette dernière en Dordogne. Les autres vins blancs sont liquoreux et sont vinifiés à partir de raisins attaqués par *Botrytis cinerea*, dans des conditions dites « pourriture noble ». Ces vins proviennent soit de la rive gauche de la Garonne (« Barsac » et « Sauternes »), soit des côteaux de la rive droite (« Premières Côtes », « Sainte-Croix-du-Mont ») et dans la Dordogne, de « Monbazillac ».

Nous avons étudié séparément les levures des régions de ces deux sortes d'appellations et nous les avons désignées par les termes : régions de raisins blancs non pourris et régions de pourriture noble.

I. — RÉGIONS DE RAISINS BLANCS NON POURRIS

Aux vendanges de 1953, nous avons prélevé 15 moûts de raisins blancs, desquels nous avons isolé 380 souches de levures fermentatives, soit environ 24 souches par moût.

La répartition de ces souches entre les divers crus est donnée dans le tableau X. Dans chaque moût, nous avons rencontré de trois à sept espèces de levures, le plus souvent cinq. Les levures de raisins blancs nous paraissent donc un peu plus variées que celles des raisins rouges. Cette observation s'explique en partie par le nombre plus élevé de souches étudiées.

Dans une Cave coopérative, nous avons prélevé deux moûts différents, l'un de densité inférieure à 13° Baumé, l'autre de densité supérieure ; ils présentent en gros les mêmes espèces de levures.

Les 380 souches fermentatives se répartissent entre deux genres non

sporogènes (*Kloeckera* et *Torulopsis*) et trois genres sporogènes (*Saccharomyces, Saccharomycodes* et *Torulaspora*). Nous avons obtenu 13 espèces, dont la liste est donnée dans le tableau XI.

Un fait apparaît en premier lieu : c'est la faible proportion de *K. apiculata* : 150 souches seulement pour 1000, alors que le genre *Saccharomyces* groupe 750 souches sur 1000. En réalité, devant le peu de diversité des *Kloeckera* rencontrées, nous avons limité le nombre des souches prélevées dans les premiers jours de la fermentation. D'ailleurs, la présence de *K. apiculata* dans 13 moûts sur 15, montre bien que cette espèce est aussi répandue que *Sacch. ellipsoïdeus*.

TABLEAU X

Répartition par cru des espèces de levures isolées.
Régions de vins blancs non pourris.

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
1	Léognan, Graves	1953	17	2 *K. apiculata.*	—	—
				9 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°8	1,51
				6 *Sacch. oviformis.*	17°9	1,20
2	Villenave d'Ornon, Graves	1953	18	1 *K. apiculata.*	—	—
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°0	1,33
				1 *Sacch. oviformis.*	18°1	1,28
				4 *T. rosei.*	13°0	0
3	Martillac, Graves	1953	30	2 *K. apiculata.*	—	—
				22 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°6	1,44
				2 *Sacch. oviformis.*	18°2	0,84
				4 *T. bacillaris.*	11°0	0,52
4	Castres, Graves	1953	28	21 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°8	1,24
				1 *Sacch. oviformis.*	13°4	1,71
				1 *Sacch. chevalieri.*	13°3	1,10
				5 *T. bacillaris.*	10°8	0,58
5	Portets, Graves	1953	27	2 *K. apiculata.*	—	—
				17 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°1	1,29
				2 *Sacch. oviformis.*	15°8	1,43
				4 *Sacch. steineri.*	15°8	1,62
				2 *Sacch. heterogenicus.*	18°2	0,73
6	Blasimon, Entre-deux-Mers	1953	18	5 *K. apiculata.*	—	—
				10 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°1	1,35
				1 *Sacch. oviformis.*	12°5	1,77
				1 *Saccharomycodes ludwigii.*	13°0	0,37
				1 *T. bacillaris.*	—	—
7	Grézillac, Entre-deux-Mers	1953	24	1 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,22
				3 *Sacch. oviformis.*	15°3	0,42
				3 *Sacch. chevalieri.*	13°9	0,53
				2 *Sacch. carlsbergensis.*	9°5	0,55
				1 *Sacch. uvarum.*	—	—
				1 *Sacch. steineri.*	—	—
8	Créon, Entre-deux-Mers	1953	23	5 *K. apiculata.*	—	—
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,40
				1 *Sacch. oviformis.*	15°6	0,33
				2 *Sacch. fructuum.*	15°4	0,92
				1 *Sacch. carlsbergensis.*	11°4	0,88

TABLEAU X *(suite)*

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
9	Rauzan, Entre-deux-Mers	1953	21	5 *K. apiculata.*	—	—
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°3	1,39
				2 *Sacch. oviformis.*	13°7	1,11
				1 *Sacch. chevalieri.*	11°2	0,54
				1 *T. rosei.*	10°7	0
10	Romagne, Entre-deux-Mers	1953	24	18 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°5	1,24
				2 *Sacch. chevalieri.*	13°0	0,30
				2 *Sacch. steineri.*	13°0	1,39
				2 *T. bacillaris.*	11°0	0,30
11	Vayres, Graves de Vayres	1953	19	3 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°8	1,13
				3 *Sacch. chevalieri.*	12°8	1,24
12	Montcarret, Dordogne	1953	33	11 *K. apiculata.*	—	—
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°4	1,36
				5 *Sacch. oviformis.*	17°9	0,93
				1 *T. rosei.*	10°6	0,15
				4 *T. bacillaris.*	9°4	0,70
13	Saint-Vivien, Dordogne.	1953	32	9 *K. apiculata.*	—	—
				17 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,41
				1 *Sacch. oviformis.*	18°2	1,32
				1 *T. rosei.*	8°4	0,46
				4 *T. bacillaris.*	11°7	0,50
14	Port Sainte-Foy, $d \geq$ 13°B	1953	31	4 *K. apiculata.*	—	—
				17 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°3	1,22
				4 *Sacch. oviformis.*	18°3	0,52
				2 *T. rosei.*	11°7	0,12
				4 *T. bacillaris.*	11°1	0,55
15	Port Sainte-Foy, $d <$ 13°B	1953	35	7 *K. apiculata.*	—	—
				17 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°0	1,29
				5 *Sacch. oviformis.*	18°2	1,04
				1 *Sacch. chevalieri.*	18°3	1,19
				5 *T. bacillaris.*	10°8	0,43

TABLEAU XI

Tableau récapitulatif des espèces de levures isolées de raisins non pourris.
(Graves, Entre-deux-Mers, Graves-de-Vayres, Côtes de Montravel, Bordeaux-Sainte-Foy).
380 souches isolées de 15 moûts.

	Nombre de souches	Fréquence p. 1000 souches	Nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Kloeckera apiculata	57	150	13	87
Torulopsis bacillaris	29	76,3	8	53
Saccharomyces ellipsoïdeus	224	589,5	15	100
Saccharomyces oviformis	34	89,4	13	87
Saccharomyces chevalieri	11	29,0	6	40
Saccharomyces fructuum	2	5,2	1	7
Saccharomyces carlsbergensis	3	7,9	2	13
Saccharomyces uvarum	1	2,6	1	7
Saccharomyces steineri	7	18,5	3	20
Saccharomyces heterogenicus	2	5,2	1	7
Saccharomyces elegans	1	2,6	1	7
Saccharomycodes ludwigii	1	2,6	1	7
Torulaspora rosei	8	21,1	4	27

Sacch. ellipsoïdeus est ainsi l'espèce la plus couramment rencontrée : 590 souches sur 1000. Puis vient *Sacch. oviformis* avec 90 p. 1000 ; ce fait est remarquable car dans les régions de vins rouges cette espèce n'avait pas présenté une si grande importance. De même, *Torulopsis bacillaris* dont le rôle était tout à fait secondaire dans les régions de vins rouges, se place au troisième rang avec 76 p. 1000. Un troisième groupe de levures, toutes sporogènes, comprend *Sacch. chevalieri*, *Sacch. steineri* et *Torulaspora rosei*. Chacune de ces espèces représente 20 à 30 p. 1000 des souches.

Les autres espèces n'ont qu'une importance secondaire. On remarque l'apparition de deux espèces de *Saccharomyces*, non représentées dans les raisins rouges, *Sacch. heterogenicus* et *Sacch. elegans*, et de *Saccharomycodes ludwigii* ; ces levures ont été trouvées chacune dans un seul moût.

Après l'association quasi-générale de *K. apiculata* et *Sacch. ellipsoïdeus*, on constate que *Sacch. oviformis* est aussi répandu que *K. apiculata* et que *T. bacillaris* et *Sacch. chevalieri* sont ensuite les levures les plus courantes.

II. — LES LEVURES DES RÉGIONS DE POURRITURE NOBLE

Nous avons prélevé douze moûts sur la rive droite de la Garonne et onze dans les vignobles de la rive gauche. Ces moûts n'étaient pas tous au même stade de la fermentation ; pour certains même, prélevés à Sainte-Croix-du-Mont et Monbazillac la fermentation était terminée.

Nous avons obtenu 573 souches fermentatives dont la répartition par cru est indiquée dans les tableaux XII (rive droite de la Garonne et Monbazillac) et XIII (rive gauche de la Garonne). Dans chaque cru, nous avons isolé deux à huit espèces. La microflore est donc ici encore très variée.

Les 573 souches se répartissent en deux genres non sporogènes (*Kloeckera* et *Torulopsis*) et trois genres sporogènes (*Saccharomyces*, *Torulaspora* et *Pichia*). Le tableau XIV indique la répartition de ces levures entre les 17 espèces isolées.

La proportion de *K. apiculata* est assez faible parmi les souches isolées bien que cette espèce soit présente dans 21 moûts sur 23. Les deux cas ne présentant pas de *K. apiculata* correspondent à des prélèvements effectués en fin de fermentation.

Le genre *Saccharomyces* est moins prépondérant que dans les régions de vins blancs non pourris, à cause de l'importance prise par *Torulopsis bacillaris*. Cette levure groupe autant de souches que *K. apiculata*. Ce fait est caractéristique des raisins attaqués par la pourriture noble.

Tableau XII

Répartition par cru des espèces de levures isolées.
(Régions de pourriture noble : Rive droite de la Garonne et Monbazillac.)

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
1	Cadillac, Premières Côtes	1953	24	1 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°0	1,54
				2 *Sacch. oviformis.*	18°3	1,22
				1 *Sacch. steineri.*	15°2	1,25
				1 *T. delbrueckii.*	13°7	0,73
				3 *T. bacillaris.*	11°4	0,47
2	Rions, Premières Côtes.	1953	5	4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°8	1,94
				1 *T. bacillaris.*	10°8	0,30
3	Cadillac, Premières Côtes	1953	29	6 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,34
				2 *Sacch. oviformis.*	18°1	1,32
				1 *Sacch. fructuum.*	13°2	1,47
				1 *Sacch. steineri.*	13°7	1,77
				1 *T. rosei.*	8°4	0
				2 *T. bacillaris.*	12°0	0,46
4	Cadillac, Premières Côtes	1953	22	4 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°6	1,32
				1 *Sacch. oviformis.*	13°4	1,35
				1 *Sacch. chevalieri.*	12°6	1,28
				1 *Sacch. steineri.*	12°8	1,28
				4 *T. bacillaris.*	10°4	0,61
5	Omet, Premières Côtes.	1953	29	5 *K. apiculata.*	—	—
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°9	1,34
				1 *Sacch. chevalieri.*	15°6	0,86
				1 *Sacch. florentinus.*	9°0	0,30
				8 *T. bacillaris.*	11°1	0,45
6	Château L, Sainte-Croix-du-Mont (vin)	1953	4	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°2	1,93
				1 *Sacch. carlsbergensis.*	13°0	1,71
7	Château L, Sainte-Croix-du-Mont (moût)	1953	24	2 *K. apiculata.*	6°4	0,98
				8 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°6	1,37
				1 *Sacch. oviformis.*	14°0	1,22
				1 *Sacch chevalieri.*	14°0	1,10
				1 *Sacch. veronae.*	8°6	0,18
				1 *T. rosei.*	9°6	0
				1 *P. fermentans.*	10°7	0,37
				9 *T. bacillaris.*	10°9	0,48
8	Vélines, Haut-Montravel	1953	29	5 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°4	1,43
				5 *Sacch. oviformis.*	16°8	1,00
				8 *T. bacillaris.*	10°7	0,47
9	Monbazillac n° 1	1953	29	6 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°8	1,69
				2 *Sacch. oviformis.*	18°3	1,23
				8 *T. bacillaris.*	9°9	0,73
10	Monbazillac n° 2	1953	29	8 *K. apiculata.*	—	—
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,61
				2 *Sacch. oviformis.*	18°4	1,19
				2 *Sacch. carlsbergensis.*	12°0	0,67
				2 *T. bacillaris.*	10°4	0,61
11	Monbazillac n° 3	1953	34	12 *K. apiculata.*	—	—
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°3	1,47
				1 *Sacch. carlsbergensis.*	10°9	0,73
				2 *T. rosei.*	10°1	0
				4 *T. bacillaris.*	10°4	0,50
12	Monbazillac n° 4	1953	31	4 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°4	1,47
				3 *Sacch. oviformis.*	13°8	1,34
				1 *Sacch. chevalieri.*	13°4	1,62
				1 *Sacch. acidifaciens.*	8°2	0,24
				6 *T. bacillaris.*	10°7	0,49

Tableau XIII

Répartition par cru des espèces de levures isolées.
(Régions de pourriture noble : Rive gauche de la Garonne.)

N° du cru	Origine	Année	Nombre de souches	Genres et espèces	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
13	Cérons, Graves	1953	28	6 *K. apiculata.*	--	—
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°5	1,50
				2 *Sacch. oviformis.*	17°7	1,77
				1 *Sacch. chevalieri.*	14°6	1,35
				5 *T. bacillaris.*	10°4	0,48
14	Saint-Pierre de Mons, Graves	1953	30	6 *K. apiculata.*	—	—
				11 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°3	1,36
				6 *Sacch. oviformis.*	18°3	0,95
				1 *Sacch. carlsbergensis.*	7°3	0,86
				1 *Sacch. steineri.*	14°6	1,59
				1 *Sacch. heterogenicus.*	14°8	0,98
				3 *T. bacillaris.*	10°8	0,52
				1 *C. mycoderma.*	—	—
15	Château Ca, Barsac ...	1953	31	1 *K. apiculata.*	—	—
				22 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,44
				3 *Sacch. oviformis.*	14°6	1,18
				1 *Sacch. steineri.*	13°8	1,77
				4 *T. bacillaris.*	10°3	0,60
16	Château Co, Barsac ...	1953	21	7 *K. apiculata.*	—	—
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°6	1,42
				2 *Sacch. acidifaciens.*	10°6	0,12
17	Château D-V, Barsac ..	1953	31	7 *K. apiculata.*	—	—
				16 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°7	1,52
				2 *Sacch. chevalieri.*	15°3	1,25
				1 *Sacch. steineri.*	14°5	1,19
				1 *Sacch. heterogenicus.*	14°5	1,22
				4 *T. bacillaris.*	11°1	0,44
18	Château P, Barsac	1953	23	1 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°1	1,41
				4 *Sacch. oviformis.*	18°2	1,05
				1 *Sacch. fructuum.*	14°9	1,04
				1 *Sacch. steineri.*	14°6	1,35
				3 *T. bacillaris.*	11°0	0,48
19	Château M, Preignac ..	1953	27	3 *K. apiculata.*	—	—
				14 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°2	1,35
				4 *Sacch. oviformis.*	18°2	1,06
				6 *T. bacillaris.*	10°8	0,48
20	Château H. P., Sauternes	1953	28	3 *K. apiculata.*	—	—
				12 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°3	1,18
				5 *Sacch. oviformis.*	17°8	1,00
				1 *Sacch. chevalieri.*	13°3	1,10
				1 *Sacch. elegans.*	11°0	0,12
				1 *T. rosei.*	9°6	0
				1 *P. membranaefaciens.*	8°6	0,18
				4 *T. bacillaris.*	11°3	0,47
21	Château R. S., Sauternes	1953	25	6 *K. apiculata.*	—	—
				13 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°5	1,45
				1 *Sacch. elegans.*	9°0	0
				5 *T. bacillaris.*	10°9	0,43
22	Château R, Fargues ...	1953	27	2 *K. apiculata.*	—	—
				15 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°7	1,42
				2 *Sacch. acidifaciens.*	8°5	1,07
				8 *T. bacillaris.*	10°2	0,52
23	Château Y, Sauternes .	1953	14	2 *K. apiculata.*	—	—
				9 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°5	1,45
				1 *Sacch. heterogenicus.*	11°0	0,06
				1 *Sacch. elegans.*	13°0	1,10
				1 *T. bacillaris.*	11°4	—

Tableau XIV

Tableau récapitulatif des espèces de levures isolées de raisins « pourris noble »
573 souches isolées de 23 moûts.

	Nombre de souches	Fréquence p. 1000 souches	Nombre de moûts	Fréquence p. 100 moûts
Kloeckera apiculata	97	169,2	21	91
Torulopsis bacillaris	98	171,0	21	91
Saccharomyces ellipsoïdeus	293	511,3	23	100
Saccharomyces oviformis	42	73,2	14	61
Saccharomyces chevalieri	8	13,9	7	30
Saccharomyces fructuum	2	3,5	2	9
Saccharomyces carlsbergensis	5	8,7	4	7
Saccharomyces florentinus	1	1,8	1	4
Saccharomyces steineri	7	12,2	6	26
Saccharomyces heterogenicus	3	5,2	3	13
Saccharomyces acidifaciens	5	8,7	3	13
Saccharomyces elegans	3	5,2	3	13
Saccharomyces veronae	1	1,8	1	4
Torulaspora rosei	5	8,7	4	17
Torulaspora delbrueckii	1	1,8	1	4
Pichia fermentans	1	1,8	1	4
Pichia membranaefaciens	1	1,8	1	4

Saccharomyces oviformis avec 73 souches p. 1000 reste une des espèces les plus importantes tandis que *Sacch. chevalieri* et *Sacch. steineri* dominent le groupe des levures secondaires. La fréquence parmi les moûts confirme ces observations. Comme *K. apiculata*, *T. bacillaris* a été trouvé dans 21 moûts pourris sur 23, tandis que *Sacch. ellipsoïdeus* est présent dans tous. *Sacch. oviformis* est ensuite l'espèce la plus répandue (61 p. 100 des moûts).

Sacch. acidifaciens et *T. rosei* ont été isolés dans les régions de raisins pourris, alors que nous n'en avions pas trouvé sur les raisins blancs sains.

Comme dans les régions de vins rouges, nous avons mesuré le pouvoir alcoogène des levures de vins blancs sur un moût suffisamment riche en sucre. Le tableau XV indique la classification des levures d'après ce test, sauf pour *Kloeckera apiculata* dont le pouvoir alcoogène est à peu près constant et toujours très faible.

Les 18 espèces étudiées peuvent former de 7 à 20° d'alcool.

Le pouvoir alcoogène de *Torulopsis bacillaris* s'échelonne entre 7 et 14° ; 90 p. 100 des souches de cette espèce forment 10 à 12°.

Les *Sacch. ellipsoïdeus* ont des pouvoirs alcoogènes très variables, entre 8 et 20° ; mais la majorité d'entre eux (80 p. 100) forme de 12 à 16°.

Les chiffres du tableau mettent en évidence le pouvoir alcoogène particulièrement élevé de *Sacch. oviformis*. Cette levure forme normalement plus de 18° d'alcool ; seules, quelques souches ont un pouvoir alcoogène plus faible, mais il est toujours supérieur à 11°.

Tableau XV

Répartition des levures des régions de vins blancs d'après leur pouvoir alcoogène.

	7° -8°	8° -9°	9° -10°	10° -11°	11° -12°	12° -13°	13° -14°	14° -15°	15° -16°	16° -17°	17° -18°	18° -19°	19° -20°	Totaux
Torulopsis bacillaris	1	1	9	50	43	4	1							109
Saccharomyces ellipsoideus		1	3	13	39	108	101	132	76	35	4	2	1	515
Sacch. oviformis					1	1	7	9	6	2	4	46		76
Sacch. chevalieri					1	3	8	3	3		1			19
Sacch. fructuum							1	1	1	1				4
Sacch. carlsbergensis	1		2	2	1	1	1							8
Sacch. florentinus			1											1
Sacch. uvarum		1												1
Sacch. steineri			1			3	3	4	1		1			13
Sacch. heterogenicus					1			2		1		1		5
Sacch. acidifaciens		2	1	1	1									5
Sacch. elegans			1		1		1							3
Sacch. veronae		1												1
Saccharomycodes ludwigii							1							1
Torulaspora rosei		2	2	3	3	1	3							14
Torulaspora delbrueckii							1							1
Pichia fermentans				1										1
Pichia membranaefaciens		1												1
Totaux	2	9	20	70	91	121	128	151	87	39	10	49	1	778

Les autres *Saccharomyces* forment des quantités d'alcool assez variables ; ceux qui peuvent en produire le plus sont *Sacch. chevalieri, fructuum, steineri* et *heterogenicus*. Les moins alcoogènes sont *Sacch. carlsbergensis, uvarum, florentinus, acidifaciens, elegans et veronae.*

L'unique souche isolée de *Saccharomycodes ludwigii* a un bon pouvoir alcoogène, 13°. *Torulaspora rosei* s'échelonne entre 8 et 14°.

Le pouvoir alcoogène des levures des régions de vins blancs est donc en moyenne assez élevé, puisque 78 p. 100 d'entre elles forment plus de 10°.

Afin de vérifier l'importance de chaque espèce dans le déroulement de la fermentation, nous avons étudié la composition des prélèvements de souches effectués à divers moments de la fermentation : avant fermentation (213 souches étudiées) ; après 20 jours de fermentation à la température du laboratoire (208 souches) et après 3 mois, c'est-à-dire à la fin de la fermentation (165 souches).

Le tableau XVI rend compte des résultats obtenus. *K. apiculata* toujours très abondant au début, disparaît rapidement, ainsi que *T. bacillaris*. Par contre, *Sacch. ellipsoïdeus* présente un maximum d'activité au milieu de la fermentation. Le nombre de ses souches décroît ensuite tandis que la quantité de *Sacch. oviformis* ne cesse de croître et atteint 38 p. 100 à la fin de la fermentation. Le même phénomène s'observe avec

TABLEAU XVI

Succession des espèces de levures au cours de la fermentation.
Régions de vins blancs.

Les chiffres indiquent les pourcentages de fréquence pour chaque prélèvement.

	Avant fermentation 213 souches	Demi-fermentation 208 souches	Fin de la fermentation 165 souches
Kloeckera apiculata	36,1	0	0
Torulopsis bacillaris	23,4	1,0	0
Total des levures non sporogènes	*59,5*	*1,0*	*0*
Saccharomyces ellipsoïdeus	31,4	87,5	50,3
Saccharomyces oviformis	0,5	2,4	38,1
Saccharomyces chevalieri	0,5	3,8	3,6
Saccharomyces fructuum	0,9	0	0,6
Saccharomyces carlsbergensis	2,3	1,0	0
Saccharomyces uvarum	0,5	0	0
Saccharomyces steineri	2,3	1,9	1,2
Saccharomyces heterogenicus	0	0,5	1,8
Saccharomyces acidifaciens	0,5	0,5	1,2
Saccharomyces elegans	0	0,5	0
Saccharomyces veronae	0	0,5	0
Saccharomycodes ludwigii	0	0	0,6
Torulaspora rosei	0,9	0,5	2,4
Torulaspora delbrueckii	0,5	0	0
Total des levures sporogènes	*40,3*	*99,1*	*99,8*

Sacch. heterogenicus, *Sacch. acidifaciens*, et *Torulaspora rosei*. L'unique souche de *Saccharomycodes ludwigii* a été isolée après la fin de la fermentation.

En résumé, il se confirme que les levures non sporogènes sont des levures de début de fermentation (59,5 p. 100 le premier jour), tandis que les levures sporogènes assurent à elles seules la fermentation dès que cette première phase est passée. On observe que *Sacch. ellipsoïdeus* agit principalement au milieu de la fermentation. Son achèvement est assuré par la participation d'autres levures parmi lesquelles *Sacch. oviformis* a un rôle prépondérant.

En conclusion, nous avons observé une grande variété parmi les souches de levures isolées dans les régions de vins blancs : 953 souches appartenant à 19 espèces.

Nous avons trouvé dans presque tous les moûts l'association classique *K. apiculata* — *Sacch. ellipsoïdeus* mais quelques caractères particuliers se sont faits remarquer selon qu'il s'agissait des régions de raisins non pourris ou des régions de pourriture noble : ainsi, *Sacch. oviformis* dans les premières et *Torulopsis bacillaris* dans les secondes prennent l'importance principale après *Sacch. ellipsoïdeus* et *K. apiculata*.

Dans la succession des espèces qui conduisent la fermentation, on observe le rôle éphémère des espèces non sporogènes qui sont très vite remplacées par les espèces sporogènes. Quelques espèces manifestent un maximum d'activité vers la fin de la fermentation, notamment *Sacch. oviformis*.

Le pouvoir alcoogène des levures des régions de vins blancs est assez élevé, mais *Sacch. oviformis* se signale encore par une aptitude exceptionnelle à produire de l'alcool. Cette espèce joue donc en définitive un rôle très important dans les fermentations de vins blancs.

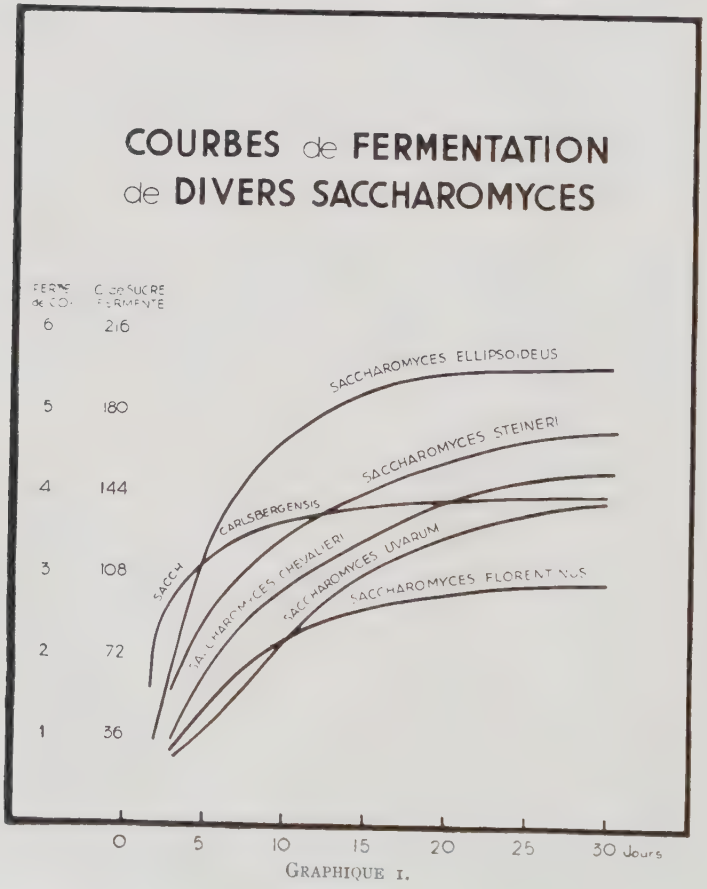
CHAPITRE VI

RÉCAPITULATION DES LEVURES DE VINIFICATION

Nos recherches nous ont permis d'isoler au total 2 023 souches de levures fermentatives à partir de 96 moûts. Les résultats obtenus, tant dans les régions de vins rouges que dans les régions de vins blancs, sont réunis dans le tableau récapitulatif XVII.

Ces levures appartiennent à cinq genres non sporogènes et six genres sporogènes, comprenant 28 espèces différentes.

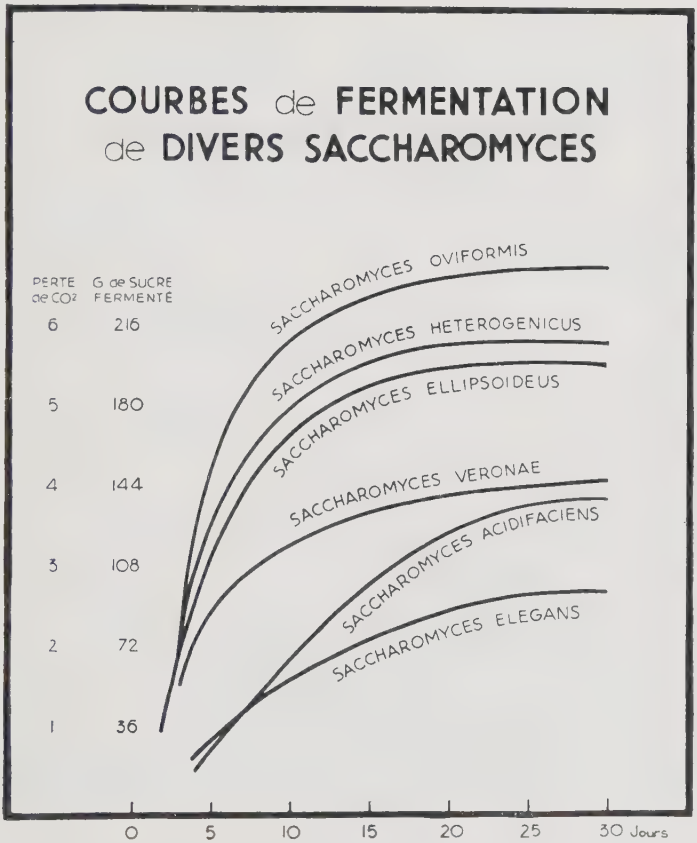
Dans nos prélèvements, les souches sporogènes sont beaucoup plus nombreuses (1 300) que les souches non sporogènes (723) ; mais nous désirions obtenir les espèces qui font réellement fermenter les moûts dans la



GRAPHIQUE 1.

pratique de la vinification et avons souvent écarté des colonies obtenues dans la première phase de la fermentation.

Les espèces les plus répandues sont *Sacch. ellipsoïdeus* et *K. apiculata* qui groupent ensemble 78 p. 100 des souches. Ces deux espèces sont associées dans presque tous les moûts étudiés. Puis vient dans la classification de fréquence *Torulopsis bacillaris* avec 6,9 p. 100 des souches. La proportion remarquable de cette espèce dans le nombre total des souches pro-



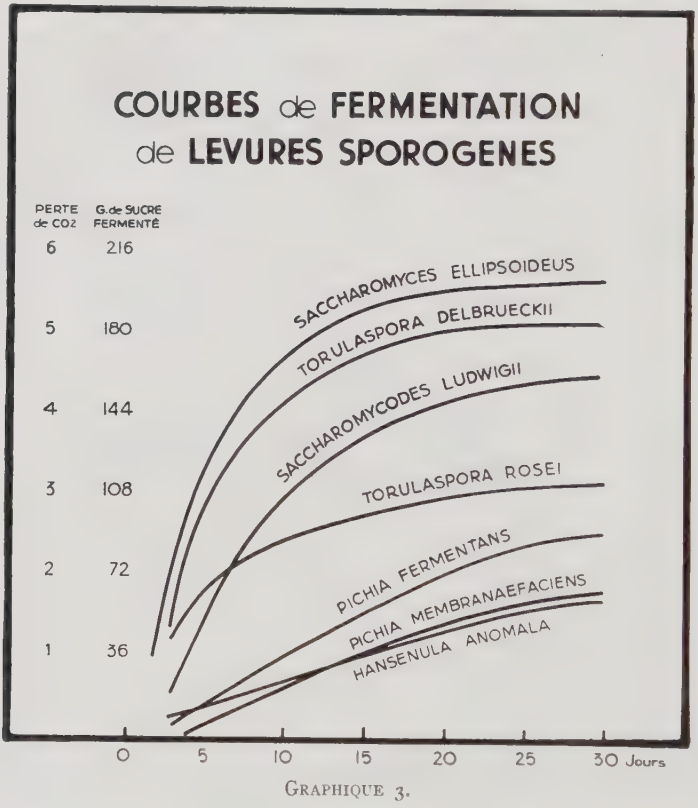
Graphique 2.

vient des régions de vins blancs où elle a une importance très grande, tout particulièrement dans les régions de raisins « pourris noble ». *Sacch. oviformis, Sacch. chevalieri,* et *Torulaspora rosei* viennent ensuite dans l'ordre d'importance.

La description de ces espèces a été donnée dans le chapitre III ; nous avons réalisé des dessins et des photographies des levures les plus typiques, cultivées en milieux liquide et solide, examinées au bout de quelques jours, et au bout d'un mois de culture.

Enfin, d'après les données que nous possédons pour chaque souche,

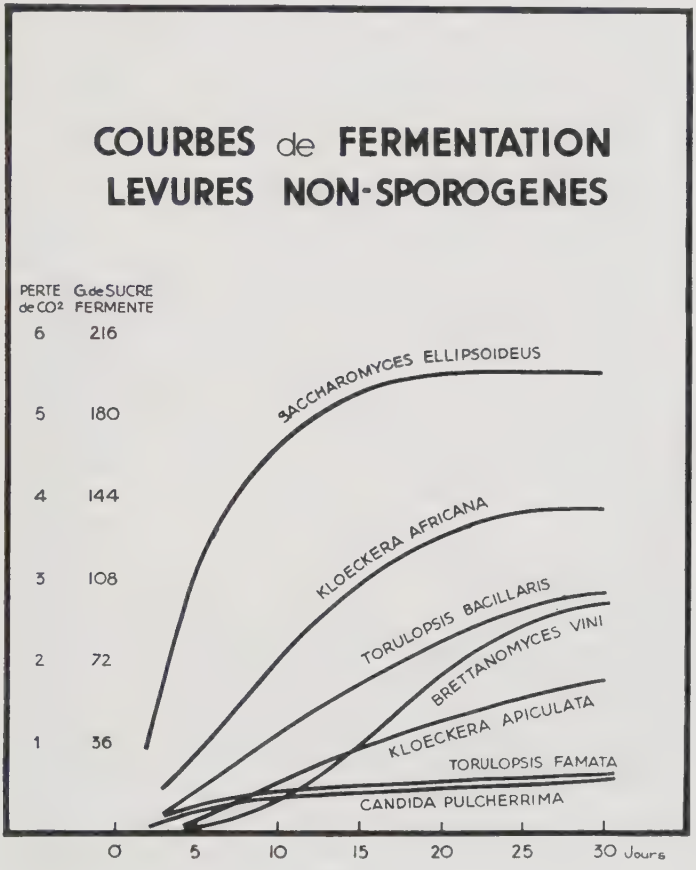
nous avons tracé les courbes de fermentation de ces espèces : elles traduisent les pertes de gaz carbonique enregistrées au cours de 30 jours, dans la fermentation d'un moût suffisamment riche en sucres, le même que celui qui a servi pour déterminer le pouvoir alcoogène et la formation d'acidité volatile. Nous avons réparti ces courbes en quatre graphiques, groupant les *Saccharomyces*, les espèces sporogènes, les espèces non sporogènes. Pour chacun, la courbe de *Sacch. ellipsoïdeus* sert de terme de comparaison.



Graphique 3.

On observe, d'après ces courbes, que *Sacch. oviformis* est l'espèce qui fait fermenter le plus rapidement et le plus complètement le moût de raisin. Les autres *Saccharomyces* ont des courbes assez semblables entre elles : la fermentation dure plus ou moins longtemps et est conduite plus ou moins loin. Parmi les autres espèces sporogènes, *H. anomala* et *P. membranaefaciens* ont des courbes voisines : la fermentation se poursuit lentement avec une vitesse constante. *P. fermentans* forme davantage d'alcool. *T. rosei* provoque un départ de fermentation rapide, mais par la suite l'allure se ralentit. *Saccharomycodes ludwigii* a une courbe dont la forme rappelle celle de *Sacch. ellipsoïdeus*.

Parmi les espèces non sporogènes, *C. pulcherrima* et *T. famata* donnent des courbes se rapprochant d'une droite ; ce sont les espèces les moins alcoogènes. Les courbes de *K. apiculata*, *T. bacillaris* et *K. africana* font progressivement la transition avec celle de *Sacch. ellipsoïdeus* tandis que les *Brettanomyces vini* ont une courbe de fermentation particulière :



Graphique 4.

le départ de la fermentation est très lent, puis vers le treizième jour, la vitesse s'accroît, la courbe présente un point d'inflexion et atteint très lentement un palier ; au bout de 30 jours, d'ailleurs, la fermentation n'est pas terminée et elle se poursuit encore plusieurs semaines.

Séparation des levures en présence d'alcool et d'actidione.

Au cours des vendanges de 1953, nous avons essayé d'augmenter la diversité des espèces isolées en additionnant le moût de produits ayant sur les levures une action sélective. Nous avons utilisé l'alcool à 4° qui empêche le développement des levures peu alcoogènes, telles les *Kloeckera*,

Tableau XVII

Tableau récapitulatif des souches isolées.

	Régions de vins rouges	Régions de vins blancs	Ensemble de la Gironde
Nombre de moûts étudiés	58	38	96
Nombre de souches isolées	1 070	953	2 023
Kloeckera apiculata	409	154	563
Kloeckera africana	1	0	1
Kloeckera jensenii	1	0	1
Torulopsis bacillaris	12	127	139
Torulopsis famata	5	0	5
Brettanomyces vini	4	0	4
Candida pulcherrima	6	0	6
Rhodotorula mucilaginosa	4	0	4
Total des levures non sporogènes	*442*	*281*	*723*
Saccharomyces ellipsoïdeus	501	517	1 018
Saccharomyces oviformis	18	76	94
Saccharomyces bayanus	3	0	3
Saccharomyces chevalieri	42	19	61
Saccharomyces fructuum	6	4	10
Saccharomyces carlsbergensis	3	8	11
Saccharomyces uvarum	6	1	7
Saccharomyces florentinus	5	1	6
Saccharomyces steineri	5	14	19
Saccharomyces heterogenicus	0	5	5
Saccharomyces acidifaciens	0	5	5
Saccharomyces elegans	0	4	4
Saccharomyces veronae	0	1	1
Saccharomycodes ludwigii	0	1	1
Torulaspora rosei	22	13	35
Torulaspora delbrueckii	0	1	1
Hansenula anomala	7	0	7
Pichia fermentans	3	1	4
Pichia membranaefaciens	2	1	3
Debaryomyces hansenii	5	0	5
Total des levures sporogènes	*628*	*672*	*1 300*

et l'actidione, antibiotique qui agit sélectivement sur les *Saccharomyces*, à 10 mg par litre. Dans une troisième série, les moûts recevaient à la fois ces deux inhibiteurs spécifiques.

En réalité, l'application de cette méthode n'a pas donné tout à fait les résultats qu'on en attendait : l'actidione ayant surtout une action fongistatique n'est efficace sur les *Saccharomyces* qu'avant le départ de la fermentation ; si elle est déjà en cours, l'actidione n'a plus aucune action inhibitrice et les *Saccharomyces* continuent à se développer. C'est ainsi que nous avons obtenu des *Saccharomyces* en présence d'actidione ou d'actidione et d'alcool.

D'autre part, l'addition combinée ayant empêché à la fois la multiplication de *K. apiculata* et de *Sacch. ellipsoïdeus*, il ne devait plus rester dans le moût qu'un très petit nombre de levures fermentatives, et les bactéries acétiques se sont abondamment développées pendant la période de latence des levures, en formant un voile épais. Dans ce cas, on ne peut obtenir de levures qu'en effectuant les prélèvements dans le moût, peu de

temps après l'addition de l'alcool et de l'actidione. Ces développements de bactéries ont beaucoup réduit le nombre des souches de levures isolées en présence d'actidione. Cependant on a recueilli 124 souches dans ces conditions, 265 en présence d'alcool et 103 quand ces deux produits sont utilisés simultanément (tableau XVIII).

TABLEAU XVIII

Isolements de levures en présence d'alcool et d'actidione.

	4 p. 100 alcool 265 souches	10 mg/l actidione 124 souches	4 p. 100 alcool 10 mg/l actidione 103 souches
Kloeckera apiculata	0,8	53,2	8,7
Torulopsis bacillaris	6,1	15,3	39,4
Candida mycoderma	0,8	16,9	24,6
Saccharomyces ellipsoïdeus	83,4	9,7	13,6
Saccharomyces oviformis	2,3	0	0,9
Saccharomyces chevalieri	1,9	0	0,9
Saccharomyces fructuum	0,4	0	0
Saccharomyces carlsbergensis	0,4	0	0
Saccharomyces florentinus	0	0	0,9
Saccharomyces steineri	1,1	0	0
Saccharomyces heterogenicus	0,4	0	0
Saccharomyces acidifaciens	0	0	0,9
Saccharomyces elegans	0,8	0	0,9
Torulaspora rosei	1,1	4,2	8,7
Pichia fermentans	0	0	0,9
Pichia membranaefaciens	0	0,8	0

En dépit de ces difficultés, nous avons pu observer que l'addition d'alcool élimine à peu près complètement *K. apiculata* et *C. mycoderma* ; les *Pichia* disparaissent tout à fait. Ont continué à se développer : les *Saccharomyces, T. bacillaris* et *Torulaspora rosei*. L'addition de 10 mg d'actidione fait apparaître la résistance à cet antibiotique de *K. apiculata*, de *T. bacillaris* et *C. mycoderma*. *T. rosei* supporte mieux l'actidione que l'alcool. Quelques souches de *Sacch. ellipsoïdeus* ont également résisté parce que la fermentation était déjà en cours au moment de l'addition.

Le mélange d'alcool et d'actidione a permis surtout le développement de *T. bacillaris* et de *C. mycoderma*.

Répartition des levures.

Nous avons observé que les levures sont relativement rares sur les raisins et que leur nombre croît à mesure que la vendange est soumise aux manipulations.

Mais la composition de la microflore se modifie aussi dans le temps : certaines espèces, prépondérantes sur les raisins, disparaissent au cours de la fermentation. Il serait intéressant de savoir ce que deviennent par exemple les cellules des *K. apiculata* qui après avoir dominé la fermenta-

tion pendant les premiers jours, disparaissent dès que les *Saccharomyces* se multiplient.

D'autres espèces à peine représentées sur les raisins, apparaissent au cours de la fermentation, et arrivent parfois à une importance remarquable vers la fin de cette transformation. C'est le cas de *Sacch. oviformis* : cette levure fortement alcoogène termine la fermentation ; elle présente un grand intérêt en œnologie car c'est elle, le plus souvent, qui fait disparaître les dernières traces de sucre. D'autre part, elle est capable de résister à des doses importantes d'acide sulfureux ; et c'est une de celles qui produisent les refermentations des vins sucrés, lorsque l'acide sulfureux libre est insuffisant dans le vin (voir chapitre VII).

Quelques espèces, secondaires par leur nombre dans la microflore, présentent cependant un certain intérêt au point de vue œnologique. *Torulaspora rosei* a un bon pouvoir alcoogène (jusqu'à 12° et 13°) et forme très peu d'acidité volatile (0 à 0,30 g au maximum). Ces propriétés ont d'ailleurs attiré l'attention des chercheurs italiens (11) qui conseillent son emploi dans les vinifications avec ferments sélectionnés, en l'associant parfois avec d'autres espèces, associations simultanées ou au contraire échelonnées.

Torulopsis bacillaris est une levure très courante dans les régions de vins blancs, et surtout dans celles où le *Botrytis cinerea* se développe. Cette levure, de qualité moyenne quant à la production d'alcool et d'acidité volatile, utilise de préférence le fructose au glucose, propriété assez rare. De plus, sa présence sur les moûts riches en sucre, provenant de raisins attaqués par la pourriture noble, confirme le fait observé par Kroemer et Krumbholz en 1931 (61), pour la souche de *T. bacillaris* qu'ils avaient isolée sur des raisins et qui était adaptée à une concentration élevée en sucre (60 p. 100).

Sacch. acidifaciens n'est pas une espèce très courante dans les moûts de raisins (2,3 p. 1 000 des souches, 3 p. 100 des moûts) ; néanmoins elle a quelques propriétés caractéristiques. Dans des fermentations anaérobies elle ne produit pas une acidité exagérée dans le milieu de culture, bien qu'elle soit très succinogène, mais nous avons observé qu'elle utilise le fructose de préférence au glucose, comme le fait *T. bacillaris* (et par ailleurs *Sacch. elegans*). Cette levure est capable de supporter de grandes quantités d'acide sulfureux. Feduchy et Marcilla (61) avaient isolé une telle levure d'un moût sulfité, et l'avaient nommée *Saccharomycodes mestris*. Lodder et K. Van Rij l'ont assimilée à *Sacch. acidifaciens*, comme nous avons pu le confirmer nous-même par comparaison avec la souche authentique que nous devons à l'amabilité du professeur Feduchy.

Nous avons trouvé quelques souches de *Brettanomyces vini*. Leur présence n'est pas seulement accidentelle, car nous les avons isolées dans deux communes assez éloignées. Il s'agit bien d'une espèce nouvelle,

car elle ne correspond pas à la description des espèces connues de *Brettanomyces*, isolées jusqu'alors dans la bière. Mais elle se rapproche beaucoup de quelques autres souches, isolées dans des vins d'Arbois et des vins mousseux allemands.

Saccharomycodes ludwigii a été observé une fois à la fin de la fermentation d'un moût de vin blanc. Cette espèce a un bon pouvoir alcoogène et forme, avec une acidité volatile non exagérée, un taux élevé d'acétate d'éthyle qui donne aux produits fermentés par cette levure le caractère de la piqûre. La résistance de cette levure à l'acide sulfureux a été signalée. Cette levure est particulièrement dangereuse pour la conservation des vins. Nous en verrons les conséquences dans le chapitre suivant.

Un certain nombre d'espèces n'ont qu'un rôle accessoire, les unes parce qu'elles ont un pouvoir fermentatif faible ou nul comme *Candida pulcherrima* et *Rhodotorula mucilaginosa*, les autres parce qu'elles sont rarement présentes dans les moûts ; certaines peuvent former des voiles superficiels plus ou moins importants et se distinguent par une production d'esters dont l'odeur reconnaissable influe sur le bouquet du vin (*Hansenula, Pichia*).

Comparaison avec les résultats des chercheurs italiens.

Notre étude ayant suivi les grandes lignes des recherches italiennes, nous avons comparé nos résultats avec ceux qui ont été obtenus par Casale, et Mensio, Capriotti et Cantarelli, Malan (15, 13, 14, 64) en Italie du Nord. En effet, la région bordelaise se trouve à peu près à la même latitude que le Piémont et la Vénétie. Castelli a reconnu que la microflore de ces régions est assez différente de celle qu'il avait observée avec ses collaborateurs dans l'Italie centrale et méridionale, ainsi qu'en Sicile et en Sardaigne, ce qui met en valeur l'influence du climat sur la microflore.

Nous avons retrouvé dans la région bordelaise les caractères principaux des levures de l'Italie septentrionale.

La fermentation est toujours commencée par les levures non sporogènes, *K. apiculata*, qui cèdent rapidement le terrain devant l'envahissement du milieu par les *Sacch. ellipsoïdeus*. Ce sont ces deux espèces de levures, présentes dans 90 à 100 p. 100 des moûts, qui contrôlent la fermentation. Par la suite, d'autres espèces apparaissent et se succèdent au cours de la fermentation qui est généralement terminée avec le concours de *Sacch. oviformis*.

Les espèces sporogènes et non sporogènes sont en nombre à peu près égal. Cet équilibre dépend du climat et varie avec la latitude. Dans l'Italie méridionale, les espèces présentes sont presque en totalité sporogènes, les levures apiculées elles-mêmes ne sont plus des *K. apiculata*,

mais des *Hanseniaspora* ; vers le 45e degré de latitude, ces espèces sont au contraire absentes, en Italie comme en France. .

Les autres espèces, présentes moins souvent ou en moins grandes quantités, mais qui jouent encore un rôle certain dans la fermentation sont : *Sacch. oviformis, Sacch. chevalieri* et *Torulaspora rosei*. En Vénétie, Capriotti a trouvé de nombreuses souches d'une levure fermentant tous les sucres et complètement le raffinose, qu'il appelle *Sacch. pastorianus*. Lodder et K. Van Rij ont décrit cette levure sous le nom de *Sacch. uvarum* et nous en avons trouvé pour notre part 7 souches en Gironde. Capriotti signale encore *Torulopsis bacillaris* avec un pourcentage important, comme nous l'avons nous-mêmes observé en Gironde.

Le pouvoir alcoogène des levures est assez bien en rapport avec le climat.

Dans les régions septentrionales d'Italie, Casale et Mensio ont trouvé que *K. apiculata* forme moins de 6° d'alcool, tandis que des concentrations plus élevées sont observées dans les régions méridionales. Capriotti et Cantarelli ont noté également que les pouvoirs alcoogènes des levures de la région de Trévise sont d'une façon générale nettement inférieurs à ce qu'ils sont plus au sud.

De même, *K. apiculata* dans la région bordelaise a un pouvoir alcoogène généralement inférieur à 5°. Cependant, parmi les *Saccharomyces*, nous avons isolé des souches qui atteignent et dépassent même 18°.

En définitive, il existe donc une ressemblance certaine quant à la microflore levurienne, entre les régions viticoles d'Italie du Nord et la région bordelaise se trouvant à une même latitude.

Influence du milieu.

Un phénomène d'adaptation des levures à la nature du moût fermenté peut être également mis en évidence. La microflore des moûts provenant de raisins pourris est assez différente de celle des moûts sains. Le *Botrytis cinerea* dont le développement exige des conditions précises d'ensoleillement et d'humidité, modifie beaucoup la composition des moûts. Il provoque la concentration du raisin par perte d'eau, produit du glycérol, fait passer dans le moût des quantités notables de dextrane, brûle l'acide tartrique, épuise le milieu en substances azotées, etc.. Le moût obtenu, très riche en sucre, a une pression osmotique élevée ; il convient mal à la multiplication de certaines levures, d'autant plus que *Botrytis cinerea* sécrète une substance antibiotique la botryticine, qui a été découverte et étudiée par S. Lafourcade (57).

La microflore des raisins pourris est effectivement différente de celle des raisins sains. *Torulopsis bacillaris* provoque ici le départ de la fermen-

tation au même titre que *K. apiculata* et parmi les levures sporogènes *Sacch. oviformis* est particulièrement répandu.

Il est certain que les espèces caractéristiques qu'on trouve dans ces régions sont sélectionnées par suite d'une adaptation à un milieu particulier.

Dans l'ensemble de notre travail les moûts que nous avons étudiés provenaient de 90 propriétés vinicoles. Les vins issus de ces vignobles n'ont pas la même qualité ni la même valeur marchande, mais nous n'avons pas trouvé que ces différences soient un reflet des variations de la composition de la microflore. Dans quelques cas particuliers, nous avons seulement observé que les levures les plus alcoogènes provenaient des régions et des crus dont les vins ont les degrés alcooliques les plus élevés. Il y a semble-t-il une sorte d'adaptation des souches de levures, entraînées à travailler sur des moûts de grande richesse sucrée. C'est là le seul caractère qui nous a paru lié au terroir.

Chapitre VII

LEVURES ISOLÉES DE VINS

On observe assez souvent dans la pratique de la conservation des vins, des développements de levures troublant la limpidité et formant des dépôts ; lorsque les vins contiennent suffisamment de sucres réducteurs, il peut se déclarer une véritable fermentation et le vin devient gazeux. Ces accidents s'observent durant la conservation en cuves, en barriques et en bouteilles. D'autre part, il arrive dans les vins liquoreux que, malgré des additions répétées d'acide sulfureux, des levures se développent et combinent peu à peu cet antiseptique. Ces accidents de refermentation des vins sucrés posent des problèmes difficiles de conservation au producteur et au négociant.

Il nous a donc paru très important d'identifier et d'étudier les espèces de levures qui restent vivantes dans les conditions habituelles de conservation et qui sont à l'origine de ces refermentations. Ces levures résistent tout particulièrement à l'alcool et à l'anhydride sulfureux. Une première étude a été publiée sur ce sujet (82), mais nous l'avons complétée depuis par un grand nombre d'observations.

Nous avons étudié 70 échantillons de vins rouges ou blancs, d'âge et d'origine divers, provenant de chais de producteurs ou de négociants, dans lesquels des développements de levures étaient apparus. Différentes lies ont été encore examinées ainsi que des moûts de raisin concentrés, et en marge de ce travail, un sirop de cassis contenant 850 g de sucre par litre et donnant des signes de fermentation.

Technique de prélèvement.

On ensemence des tubes de moût de raisin stérilisé avec du vin à examiner ou avec son dépôt ; on peut avoir intérêt à centrifuger si le vin contient peu de levures. Quand la fermentation s'est déclarée, on prépare une boîte de Pétri de moût gélatiné selon la technique habituelle. Quand le développement des colonies est suffisant, on prélève 3 colonies avec un fil de platine.

Chaque échantillon nous a ainsi donné trois souches, qui ont été soumises aux tests décrits dans le chapitre II. Le nombre de colonies

prélevé peut paraître faible, mais il est suffisant. Nous avons observé que le nombre d'espèces de levures capables de faire fermenter un vin est assez réduit et que la plupart du temps les refermentations des vins sont conduites par une seule espèce, plus rarement par deux. Alors que dans la fermentation d'un moût un grand nombre d'espèces de levures interviennent, la fermentation d'un vin peut être considérée le plus souvent comme une fermentation pure.

Levures isolées.

Les tableaux XIX et XX reprennent un à un les cas examinés, et énumèrent les espèces isolées ; nous y faisons figurer les degrés alcooliques moyens que les souches sont capables d'atteindre et les acidités volatiles qu'elles forment. Le tableau XXI récapitule ces résultats et donne, par espèce, le nombre de souches trouvées.

TABLEAU XIX

Levures isolées de vins rouges

Origine	Millésime	Dates des prélèvements	Souches isolées	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
			Vins conservés en fûts		
Saint-Julien	1952	5-1953	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°9	1,90
Pomerol	1952	10-1953	3 *Sacch. chevalieri.*	15°0	1,04
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°7	1,53
Saint-Caprais (hybrides)	1953	12-1953	4 *Sacch. ellipsoïdeus.*	—	—
			1 *Sacch. carlsbergensis.*	12°1	0,73
Soussans	1953	6-1954	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°3	1,85
Bordeaux	1953	7-1954	3 *Sacch. oviformis.*	14°8	1,73
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°0	1,71
Saint-Caprais	1955	11-1955	3 *Sacch. acidifaciens.*	—	—
Lie de vin du Médoc	1953	5-1954	2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	18°5	1,34
			1 *Sacch. oviformis.*	18°6	1,56
Lie de filtre	—	8-1955	3 *Sacch. oviformis.*	—	—
Dépôt sur bondes	1953	4-1954	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°5	1,59
			1 *Sacch. elegans.*	9°0	0,70
			Vins conservés en bouteilles		
Saint-Émilion	1945	1-1953	4 *Sacch. elegans.*	9°4	1,59
Vin rouge	—	6-1953	2 *Sacch. oviformis.*	18°9	1,56
Bordeaux C	1951	4-1953	2 *Sacch. acidifaciens.*	—	—
Clairet C	1952	9-1953	3 *Brett. schanderlii.*	8°0	—
Ordonnac	1950	12-1953	3 *Sacch. oviformis.*	18°2	1,59
Saint-Émilion	1950	5-1954	3 *Sacch. oviformis.*	17°0	1,44
Saint-Émilion	1953	5-1954	3 *Sacch. heterogenicus.*	12°5	0,46
Clairet	1952	7-1954	2 *Sacch. oviformis.*	17°4	1,42
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	—	—
Côtes du Rhône	—	10-1954	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°7	1,80
Saint-Émilion	1949	1-1955	2 *Sacch. oviformis.*	15°4	1,41
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°2	1,47
Pomerol	1950	10-1955	3 *Sacch. heterogenicus.*	—	—

Si l'on excepte les examens des échantillons de sirops, moûts de raisins concentrés, lies diverses, qui seront envisagés plus loin, 207 souches de levures ont été recueillies provenant de 70 échantillons de vins. Ces souches appartiennent à 3 genres différents et à 9 espèces.

Tableau XX

Levures isolées de vins blancs

Vins conservés en cuves prélevés dans les chais de négociants.

N°	Dates des prélèvements	Souches isolées	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
1	6-1954	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°9	1,10
2	—	2 *Sacch. oviformis.*	15°1	1,57
		1 *Sacch. acidifaciens.*	9°4	0,89
3	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°9	1,14
4	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	10°2	1,14
5	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°9	1,08
6	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°3	0,93
7	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	10°7	0,89
8	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	10°2	0,92
9	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	10°2	1,07
10	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	8°9	0,92
11	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°9	1,09
12	—	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	10°5	0,76
13	—	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	10°8	0,71
14	—	3 *Sacch. acidifaciens.*	8°9	1,42
15	—	3 *Sacch. oviformis.*	14°2	1,63
16	9-1954	3 *Sacch. oviformis.*	12°3	1,86
17	—	2 *Sacch. oviformis.*	13°7	1,73
		1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	11°8	2,02
18	—	3 *Sacch. oviformis.*	13°6	2,01
19	—	2 *Saccharomycodes ludwigii.*	11°6	1,38
		1 *Sacch. oviformis.*	12°5	1,50
20	—	2 *Saccharomycodes ludwigii.*	10°4	0,98
		1 *Sacch. oviformis.*	14°5	1,77
21	—	3 *Sacch. oviformis.*	13°1	2,08
22	—	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°5	1,69
23	—	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	12°9	2,14
		2 *Sacch. oviformis.*	13°2	2,02

Ce sont surtout les *Saccharomyces* qui sont représentés. *Sacch. oviformis* est l'espèce prédominante, en particulier si l'on considère les vins blancs ; elle constitue 37 p. 100 des souches. On a déjà vu que cette levure devient prépondérante à la fin de la fermentation ; sa résistance à l'alcool lui permet de faire fermenter les dernières traces de sucre et on comprend qu'elle résiste aux conditions de la conservation. *Sacch. acidifaciens*, levure résistant à l'acide sulfureux, forme 26 p. 100 des souches. Il semble que *Sacch. oviformis* cause surtout la refermentation des vins à degré alcoolique élevé et que *Sacch. acidifaciens* fasse plus couramment fermenter les vins sulfités de degré moyen. *Sacch. ellipsoïdeus* ne vient qu'au troisième rang avec 16,5 p. 100 des souches et on ne note que 5 cas de refermentation par cette levure, la plupart se rapportant à des vins jeunes.

TABLEAU XX *(suite)*

Origine	Millésime	Dates des prélèvements	Souches isolées	Degré moyen	Acidité volatile moyenne
			Vins blancs conservés en fûts		
Saint-Caprais	—	9-1953	2 *Sacch. oviformis.*	18°3	1,36
Bordeaux supérieur	—	9-1953	2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	18°3	1,25
L. G.	—	3-1954	2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	16°9	1,52
			1 *Sacch. oviformis.*	16°6	1,53
A.	—	5-1954	3 *Sacch. oviformis.*	17°9	1,65
L	—	5-1954	2 *Sacch. oviformis.*	13°3	1,95
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°8	1,96
Saint-Maixent	1953	6-1954	3 *Sacch. oviformis.*	18°4	1,52
Cambes		12-1954	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°4	1,60
Martillac	1953	12-1954	2 *Sacch. oviformis.*	14°4	1,50
			1 *Sacch. heterogenicus.*	13°5	1,65
Graves sec	1954	1-1955	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°4	1,38
Graves doux	1954	1-1955	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°1	1,43
Villefranche n° 8	1953	11-1954	3 *Sacch. oviformis.*	12°3	1,91
Villefranche n° 9	1953	11-1954	3 *Sacch. acidifaciens.*	9°2	1,38
Sainte-Croix-du-Mont n° 1	1953	12-1954	2 *Sacch. oviformis.*	14°2	1,87
			1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	15°3	1,83
Sainte-Croix-du-Mont n° 2	1953	12-1954	2 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°5	1,70
			1 *Sacch. oviformis.*	10°8	1,77
			Vins blancs conservés en bouteilles		
C		5-1954	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	13°9	—
L		5-1954	2 *Sacch. elegans.*	9°7	1,83
			1 *Sacch. acidifaciens.*	9°7	1,10
N		5-1954	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	12°9	1,09
VBL		5-1954	3 *Sacch. oviformis.*	14°5	0,73
Bordeaux supérieur		7-1954	3 *Sacch. oviformis.*	13°6	1,62
Premières Côtes	1952	7-1954	3 *Sacch. oviformis.*	14°2	2,15
Premières Côtes	1953	10-1954	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	13°3	1,62
			2 *Sacch. oviformis.*	14°8	1,62
Haut Montravel	1952	10-1954	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°6	1,53
			2 *Sacch. oviformis.*	14°6	1,96
A.		7-1954	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	10°6	0,98
Bordeaux		9-1954	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°6	1,25
			2 *Sacch. oviformis.*	14°8	1,41
Graves supérieures	1953	2-1955	1 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°9	1,41
			2 *Sacch. oviformis.*	14°6	1,35
Bourgogne n° 1		9-1955	3 *Sacch. oviformis.*	—	—
Bourgogne n° 2		9-1955	3 *Sacch. oviformis.*	—	—
Bordeaux L		2-1955	3 *Saccharomycodes ludwigii.*	9°1	0,83
Bordeaux D		11-1955	1 *Candida mycoderma.*	—	—
			1 *Sacch. acidifaciens.*	—	—
Moût de raisin concentré 24°B		7-1954	3 *Sacch. ellipsoïdeus.*	14°5	1,43
Moût de raisin concentré 36°B		9-1955	3 *Sacch. rouxii.*	—	—
Sirop de cassis		5-1954	3 *Sacch. rouxii.*	13°2	0,09

Saccharomycodes ludwigii, dont aucun exemplaire n'a été rencontré dans les vins rouges, est responsable de près de 15 p. 100 des cas de refermentation des vins blancs. C'est une levure spécifique des vins blancs sulfités. Rencontrée une seule fois à la fin de la fermentation d'un moût de raisins blancs, elle est par contre très courante dans les vins blancs

sucrés conservés avec de l'acide sulfureux. Dans ces vins son développement revêt une forme caractéristique : elle constitue des amas de levures, ressemblant à des flocons, difficiles à désagréger par agitation. Les cellules se multiplient à l'intérieur de ces flocons, d'où part de temps en temps une bulle de gaz carbonique. Les cellules de la périphérie combinent l'acide sulfureux par production d'éthanal et protègent ainsi les levures du centre. La fermentation se généralise lorsque la teneur en acide sulfureux libre est tombée au voisinage de zéro.

TABLEAU XXI

Tableau récapitulatif des levures de vin

	Isolées de vins rouges	Isolées de vins blancs	Totaux
Nombre de vins examinés	17	53	70
Nombre de souches isolées	*54*	*153*	*207*
Sacch. ellipsoïdeus	17	17	34
Sacch. oviformis	15	62	77
Sacch. chevalieri	3	0	3
Sacch. carlsbergensis	1	0	1
Sacch. heterogenicus	6	1	7
Sacch. acidifaciens	5	49	54
Sacch. elegans	4	2	6
Saccharomycodes ludwigii	0	22	22
Brettanomyces schanderlii	3	0	3

Les autres espèces *Sacch. chevalieri, Sacch. carlsbergensis, Sacch. heterogenicus, Sacch. elegans* et *Brettanomyces schanderlii* n'ont été rencontrées qu'un petit nombre de fois et presque toujours dans des vins rouges. Huit espèces ont été identifiées dans ces vins. La microflore des vins rouges qui refermentent est plus variée que celle des vins blancs. On note dans les vins rouges en fûts au cours de la première année une proportion importante de *Sacch. ellipsoïdeus* (55 p. 100) et peu de *Sacch. oviformis*. Dans les vins rouges en bouteilles au contraire, *Sacch. oviformis*, plus résistant, forme 37 p. 100 des souches ; de même on ne trouve *Sacch. elegans* que dans les vins en bouteilles.

Brettanomyces schanderlii a été rencontré une fois, dans un « clairet », conservé en bouteille, où trois souches identiques ont été isolées. Ces trois souches répondaient assez approximativement à la description de *T. delbrueckii*, mais comme nous n'avons pu observer de spores, nous les avons classées parmi les espèces non sporogènes. De plus les courbes de fermentation de ces souches sont très différentes de celles de *T. delbrueckii* et ressemblent par contre à celles des *Brettanomyces*, car elles présentent un point d'inflexion au bout du même temps. La seule espèce de *Brettanomyces* qui fait fermenter le glucose et le galactose est *Brettanomyces schanderlii* que nous avons ainsi appelée (83) parce qu'elle a d'abord été isolée par le professeur SCHANDERL d'un vin mousseux allemand. Malgré

quelques différences notamment dans la forme des cellules, nous avons donc assimilé nos trois souches à *Brettanomyces schanderlii*.

Pour les vins blancs, les degrés plus élevés que l'on atteint dans une certaine catégorie de vins liquoreux, et l'emploi généralisé de l'acide sulfureux limitent le nombre des espèces et sélectionnent les plus résistantes. C'est ainsi qu'on note la prépondérance de *Sacch. oviformis* avec 41 p. 100 et la présence très fréquente de *Sacch. acidifaciens* (32 p. 100), alors que cette levure était absente des vins rouges. En fait ce sont ces trois levures qui sont responsables dans les vins blancs de la majorité des accidents et qui doivent être considérées comme de véritables levures de maladie.

La classification suivant les conditions de conservation montre que les levures qui se maintiennent longtemps dans les cuves sont surtout *Sacch. acidifaciens* (49 p. 100 des souches), puis *Sacch. oviformis* (29 p. 100) et *Saccharomycodes ludwigii* (14 p. 100). En fûts, *Sacch. oviformis* prédomine (47 p. 100), tandis que *Sacch. acidifaciens* représente encore 30 p. 100 des cas. Enfin les espèces qui provoquent la fermentation en bouteilles et souvent plusieurs mois après la mise, sont *Sacch. oviformis* (dans plus de la moitié des cas) et *Saccharomycodes ludwigii* (27 p. 100).

En résumé, on trouve dans les vins rouges la plupart des levures de fin de fermentation, tandis que dans les vins blancs on ne trouve qu'un petit nombre d'espèces de levures plus résistantes, en particulier à l'acide sulfureux. Les levures trouvées dans les vins rouges restés sucrés sont des levures finisseuses et leur présence est utile à l'achèvement du vin ; les levures trouvées dans les vins blancs sucrés constituent, par contre, un danger pour leur conservation et il convient de mettre en œuvre tous les moyens pour s'en débarrasser.

Observations diverses.

Nous avons rassemblé dans un autre groupe des échantillons de provenances diverses qui ont permis de séparer une vingtaine de souches de levures. Dans la lie d'un vin vieux du Médoc, nous avons trouvé *Sacch. ellipsoïdeus* et *Sacch. oviformis*. Dans les dépôts de consistance grasse qui se forment souvent sur le dessus des fûts, dans la partie restant humide, autour des trous de bonde, nous avons trouvé *Sacch. ellipsoïdeus* et à plusieurs reprises, *Sacch. elegans*.

Trois produits très riches en sucre ont été également étudiés. Dans un moût de raisin concentré à 24° Baumé, nous n'avons trouvé que *Sacch. ellipsoïdeus*. Par contre dans un moût sirupeux à 36° Baumé et dans un sirop de cassis à 850 g de sucre par litre, nous avons identifié des souches de *Sacch. rouxii*. Cette espèce qui, avant Lodder et K-Van Rij était classée dans le genre *Zygosaccharomyces*, est bien connue pour ses propriétés osmophiles. Elle a la possibilité de se développer dans des milieux très concentrés en sucre ou en sels, à pression osmotique élevée.

CONCLUSIONS

Nous avons isolé au cours de trois vendanges successives (1951-1952-1953), 2023 souches de levures provenant de raisins et de moûts de raisin en fermentation, prélevés dans 96 propriétés et crus de la région bordelaise. L'identification et la classification de ces souches, qui nous ont demandé cinq années de travail, ont permis de distinguer, uniquement parmi les levures douées du pouvoir de faire fermenter le moût de raisin, 28 espèces différentes appartenant à 11 genres. Nous avons caractérisé 5 genres non sporogènes, représentant 723 souches, et 6 genres sporogènes, représentant 1 300 souches.

Les méthodes de prélèvement, d'isolement, de culture, d'identification et de classification que nous avons employées, sont les méthodes classiques, codifiées et décrites dans la monographie de Lodder et Kreger-Van Rij. Nous avons utilisé plus particulièrement les techniques employées par le Professeur Castelli, de l'Institut microbiologique de la Faculté de Pérouse.

Nous n'avons eu à procéder qu'à des modifications de détail, qui ne sont pas cependant sans intérêt. Nous avons vu la nécessité d'étudier non seulement la microflore des raisins prélevés aseptiquement à la vigne, mais encore du moût ou de la vendange en fermentation dans les fûts et dans les cuves. Il fut très instructif d'étudier les levures qui restent dans le vin après plusieurs mois et même plusieurs années de vieillissement. Nous avons également apporté beaucoup de soins à suivre dans le déroulement de la fermentation, *la succession et le relai* des différentes espèces de levures. Nous pensons que ces observations éclairent mieux le processus fermentaire dans les conditions de la pratique et de la conservation des vins.

En ce qui concerne les descriptions morphologiques, nous nous sommes soumis aux règles habituelles, mais nous avons tenu à donner, en plus des dessins qui schématisent les cellules de levure, des photographies à fort grossissement obtenues au microscope à contraste de phase, pour les espèces les plus caractéristiques.

Les tests de fermentation des divers sucres ont été conduits avec la méthode classique ; cependant, à la fin de notre étude et à la suite des travaux de Madeleine Lafon à ce sujet, il nous a semblé qu'il serait facile de les rendre plus rapides et tout à fait sûrs, par des mesures manométriques effectuées à l'appareil de Warburg. On a intérêt encore à suivre la

fermentation du raffinose par le dosage final des sucres réducteurs, à l'aide de la liqueur de FEHLING, pour déterminer si la levure est capable ou non de faire fermenter le mélibiose. Dans le même ordre d'idée, la liquéfaction de la gélatine, qui n'est pas à vrai dire une propriété déterminante pour la classification, pourrait être mesurée par formoltitration des acides aminés libérés par la protéase des levures et devenir ainsi un test plus rigoureux.

Enfin nos recherches étant conduites surtout dans un but œnologique nous avons toujours déterminé le pouvoir alcoogène des souches isolées ainsi que la quantité d'acide acétique qu'elles forment au cours de la fermentation. Nous avons tracé pour chaque souche les courbes de fermentation du sucre en fonction du temps. Enfin, nous avons encore comparé pour chaque espèce la fermentation sélective du glucose et du lévulose qui forment le sucre inverti, et ce nouveau caractère constitue une base très sûre de différenciation de certaines espèces. On sait que la plupart des levures font fermenter sélectivement le glucose, tandis qu'un petit nombre d'espèces typiques utilisent de préférence le lévulose ; enfin quelques autres levures font fermenter les deux sucres avec la même vitesse.

Ces méthodes de travail nous ont permis de mettre en évidence dans le moût de raisin les espèces suivantes :

Kloeckera apiculata, Kloeckera africana, Kloeckera jensenii.

Torulopsis bacillaris, Torulopsis famata.

Brettanomyces vini.

Candida pulcherrima, (Candida mycoderma).

Rhodotorula mucilaginosa.

Saccharomyces ellipsoïdeus, Sacch. oviformis, Sacch. bayanus, Sacch. chevalieri, Sacch. fructuum, Sacch. carlsbergensis, Sacch. uvarum, Sacch. florentinus, Sacch. steineri, Sacch. heterogenicus, Sacch. acidifaciens, Sacch. elegans, Sacch. veronae.

Saccharomycodes ludwigii.

Torulaspora rosei, Torulaspora delbrueckii.

Hansenula anomala.

Pichia fermentans, Pichia membranaefaciens.

Debaryomyces hansenii.

Le chapitre III donne une description détaillée de chacune de ces espèces.

Dans le chapitre IV nous rendons compte de nos recherches dans les régions de vins rouges : Médoc, Libournais, Graves, Premières Côtes de Bordeaux. 1 070 souches isolées se répartissent en 628 sporogènes, et 442 ne donnant pas de spores. Deux espèces dominent et représentent 80 p. 100 des souches isolées : *Kloeckera apiculata* et *Saccharomyces ellipsoïdeus*. Les espèces complémentaires sont irrégulièrement réparties et restent beaucoup moins importantes ; parmi elles, *Sacch. chevalieri* et *Torulaspora rosei* sont les plus représentées. Nous avons rencontré quel-

ques espèces rares qui n'avaient pas été trouvées dans de tels milieux, comme *Sacch. fructuum, Pichia fermentans, Torulopsis famata*. De même ont été isolées quatre souches de *Brettanomyces* à une époque où ce genre de levure n'avait pas encore été rencontré dans les vins.

Le pouvoir alcoogène varie fortement, comme il est connu, d'une espèce à l'autre, et il varie aussi dans le cadre d'une même espèce suivant les souches. Les *Kloeckera apiculata* forment de 3 à 6° d'alcool tandis que les *Sacch. ellipsoïdeus* en produisent de 8 à 17°. D'une façon générale, le pouvoir alcoogène des levures du Libournais est plus élevé que celui des levures du Médoc.

Dans le chapitre V qui traite des levures des régions de vins blancs, nous indiquons la répartition des 953 souches isolées : 672 sporogènes, 281 non sporogènes. Nous distinguons les régions de raisins non pourris, ou peu pourris, donnant des vins secs ou peu sucrés, et les régions de « pourriture noble », dans lesquelles, grâce au *Botrytis cinerea* qui attaque la pellicule et permet la concentration du suc du raisin, on obtient des vins du type liquoreux. La microflore de base de ces deux régions paraît être sensiblement la même, cependant on enregistre l'importance remarquable de *Sacch. oviformis* et de *Torulopsis bacillaris* ; cette dernière espèce semble spécifique des raisins pourris. Le fait que *Botrytis cinerea* sécrète un antibiotique antilevure n'est peut-être pas étranger à la modification de la microflore constatée dans les raisins pourris. On pourra être frappé également par le fait que *Sacch. oviformis* ne constitue que 16,8 p. 1000 des souches issues de vendanges rouges, et 79 p. 1 000 de celles provenant de moûts blancs. Apparaissent également certaines espèces non représentées dans les raisins rouges : *Sacch. heterogenicus, Sacch. acidifaciens, Sacch. elegans, Saccharomycodes ludwigii*.

Le pouvoir alcoogène des levures des régions de vins blancs est dans l'ensemble plus élevé que dans les régions de vins rouges. Les moûts blancs étant généralement plus riches en sucre que les moûts rouges, ces faits confirment l'adaptation des levures des vignobles aux milieux qu'elles font habituellement fermenter.

En étudiant la succession des espèces au cours de la fermentation, on retrouve l'image qui en a été donnée par les auteurs d'études précédentes : les levures non sporogènes assurent le départ et la première phase de la fermentation. Ce sont *K. apiculata* pour les moûts rouges, *K. apiculata* et *T. bacillaris* pour les moûts de raisins blancs. Puis très rapidement les levures sporogènes envahissent le milieu, notamment les *Saccharomyces* et *T. rosei*, de telle façon qu'à la fin de la fermentation on ne retrouve plus aucune espèce non sporogène. A ce moment, dans les moûts riches, l'espèce dominante est *Sacch. oviformis* levure finisseuse qui se caractérise par un pouvoir alcoogène élevé.

Après avoir récapitulé dans le chapitre VI la répartition des 2 023

souches de levures fermentatives isolées, nous relatons les résultats d'essais ayant pour but d'étudier l'action de certains agents inhibiteurs sélectifs, tels que l'éthanol et l'actidione, sur la microflore isolée. L'addition d'alcool élimine *Kloeckera apiculata* et les levures de faible pouvoir fermentatif ; l'addition d'actidione, antibiotique antifongique, à condition qu'elle soit pratiquée avant tout départ de la fermentation, fait disparaître presque entièrement les *Saccharomyces*, ce qui met en valeur le nombre des *K. apiculata* et *Torulopsis bacillaris* ; l'addition simultanée d'alcool et d'actidione ne laisse que quelques levures de pouvoirs alcoogènes moyens : *Torulopsis bacillaris*, *Torulaspora rosei*, à côté de levures non fermentatives.

Dans ce même chapitre, nous mettons en relief le rôle particulier que jouent dans la vinification des levures telles que *T. rosei*, *T. bacillaris*, *Sacch. acidifaciens*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Brettanomyces vini*. Enfin nous comparons nos résultats avec ceux que les chercheurs italiens ont obtenus dans les régions d'Italie situées à la même latitude que la Gironde, et nous constatons qu'ils concordent assez bien, en ce qui concerne tout au moins les vendanges rouges. Comme l'a démontré CASTELLI, le climat a une influence déterminante sur la microflore de la fermentation. Mais les modifications profondes apportées par l'intervention du *Botrytis cinerea* n'avaient pas été observées par les auteurs italiens.

L'étude consacrée aux levures restant dans les vins après vieillissement et susceptibles de provoquer leur refermentation lorsqu'ils présentent encore du sucre, fait l'objet du septième chapitre. 207 souches provenant de 70 échantillons de vins blancs et rouges, ont été isolées et identifiées. Ce sont des espèces de fin de fermentation, douées de propriétés bien particulières, qui sont résistantes à l'alcool et de plus, dans les vins blancs, résistantes à l'acide sulfureux. Certaines de ces espèces sont très rarement rencontrées dans les moûts et deviennent par contre très courantes dans les vins blancs ; il en est ainsi pour *Saccharomycodes ludwigii*, *Sacch. acidifaciens*. On peut les assimiler à de véritables levures de maladie, occasionnant des troubles et des diminutions de qualité considérables.

Mais la levure le plus couramment à l'origine des refermentations des vins est *Sacch. oviformis* ; nous l'avons trouvée dans 33 échantillons sur 70, seule 16 fois, associée à une autre levure 17 fois. *Sacch. oviformis* présente donc une importance considérable en œnologie : levure finisseuse, sa présence est souhaitable au cours de la fermentation des vins qui ne doivent pas conserver de sucre (vins rouges, vins blancs secs), mais, levure de refermentation, il faudrait pouvoir l'éviter dans les vins que l'on veut conserver sucrés. La vinification de ces deux catégories de vins serait considérablement améliorée si l'on pouvait être parfaitement maître du développement de cette levure, et tout particulièrement s'il était possible de l'inhiber spécifiquement.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Agostini (O.). — *L'agricoltura italiana.* **193**, 1950.
(2) Antoniani (C.). — *Ind. agrar. Progr. vinic. agrar.*, 1947.
(3) Barnett (J. A.) et Ingram (M.). — *Journ. Applied Bact.*, **18**, 131, 1955.
(4) Barret (A.), Bidan (P.) et André (L.). — *C. R. Acad. Agric.*, **41**, 426, 1955.
(5) Beraud (P.). — *Arch. Inst. Pasteur.* Tunis, **26**, 723, 1937.
(6) Beraud (P.). — *Ann. Ferm.*, **4**, 242, 1938.
(7) Bidan (P.) et André (L.). — *X^e Congrès Intern. Ind. agric. alim. Madrid*, 1954.
(8) Bouthilet (R. J.), Neilson (N. E.), Mrak (E. M.) et Phaff (H.). — *Journ. of general Microb.*, **3**, n° 2, 1949.
(9) Bremond (E.) et Courtoisier (A.). — *Bull. Intern. Vin*, n° 294, 96, 1955.
(10) Cantarelli (C.). — *Boll. Soc. Biol. sperim.*, **26**, 2, 1950.
(11) Cantarelli (C.). — *Rivista viticolt. enol. Conegliano*, **6**, 82, 1953.
(12) Capriotti (A.). — *Ann. Facolta di agraria, Perugia*, **8**, 1952.
(13) Capriotti (A.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **5**, 1953.
(14) Capriotti (A.) et Cantarelli (C.). — *Rivista viticolt. enol. Conegliano*, n° 6, 7, 8, 1952.
(15) Casale (L.) et Mensio (C.). — *Bull. Intern. Vin*, **91**, 131, 1935.
(16) Castelli (T.). — *Nuovi Annali dell'Agricoltura*, **19**, 1939.
(17) Castelli (T.). — *Ann. di Microb.*, **19**, Fasc. 6, 1941.
(18) Castelli (T.). — *Ann. di Microb.*, **20**, Fasc. I, 1941.
(19) Castelli (T.). — *Ann. di Microb.*, **20**, Fasc. 4, 1942.
(20) Castelli (T.). — *La Ricerca scientifica*, **18**, 1948.
(21) Castelli (T.). — *Rivista viticolt. enol. Conegliano*, n° 8, 1948.
(22) Castelli (T.). — *Ann. Facolta di agraria, Perugia*, t. 5, 1948.
(23) Castelli (T.). — *Ann. Accad. agric., Torino*, **49**, 91, 1948.
(24) Castelli (T.). — *Rivista viticolt. enol., Conegliano*, n° 5 et 6, 1950.
(25) Castelli (T.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **2**, 1950.
(26) Castelli (T.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **4**, 1952.
(27) Castelli (T.). — *Rev. Ferm. Ind. alim.*, **7**, 35, 1952.
(28) Castelli (T.). — *IX^e Congrès Intern. Ind. agric.*, Rome, 1952.
(29) Castelli (T.). — *VI^e Congrès Intern. Microb.*, Rome, 1953, *in Archiv. für Mikrob.*, **20**, 323, 1954.
(30) Castelli (T.). — *X^e Congrès Intern. Ind. agric.*, Madrid, 1954.
(31) Castelli (T.) et Del Giudice (E.). — *Rivista viticolt, enol., Conegliano*, n° 10, 11, 12, 1953.
(32) Castelli (T.) et Del Giudice (E.). — *Rivista viticolt. enol., Conegliano*, **8**, 127, 1955.
(33) Ciferri (R.) et Verona (O.). — *Mycopathologia*, **4**, 243, 1948.
(34) Cordier (J. A.). — *Ann. Brass. Dist.*, **9**, 62, 1906.
(35) Descoffre (A.). — Etude sur les levures œnogènes des Charentes. Thèse Pharmacie, Bordeaux, 1904.
(36) Diddens (H. A.) et Lodder (J.). — Die anaskosporogenen Hefen, II Halfte, Amsterdam, 1942.
(37) Fernbach (A.), Schoen (M.) et Mori (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **42**, 805, 1928.
(38) Florenzano (G.). — *Ann. sperim. agrar.*, **3**, 887, 1949.

(39) Florenzano (G.). — *La Ricerca scientifica*, **20**, 1494, 1950.
(40) Florenzano (G.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **3**, 236, 1951.
(41) Gallay (R.), Benvegnin (L.), Capt (E.). — *Annuaire agric. de la Suisse*, **53**, 915, 1952.
(42) Galzy (P.). — *Progrès agric. et vitic.*, **141**, 150, 1954.
(43) Galzy (P.). — *Ann. Technologie agric.*, **4**, 417, 1955.
(44) Galzy (P.) et Rioux (J. A.). — *Progrès agric. et vitic.*, **144**, 365, 1955.
(45) Gayon (U.) et Dubourg (E.). — *C. R. Acad. Sci.*, **110**, 865, 1890.
(46) Genevois (L.). — *Ind. Agric. Alim.*, **66**, 329, 1949. *Bioch. Bioph. Acta*, **4**, 179, 1950. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, **6**, 18, 43, 88 et 111, 1951. — *Bull. Ass. Microbiol.*, Nancy, n° 44, 1951.
(47) Glaubitz (M.). — *Atlas des organismes de fermentation.* — Dunod, Paris, 1936.
(48) Gray (W. D.). — *American Journ. of Botany*, **36**, 475, 1949.
(49) Guilliermond (A.). — Clef dichotomique pour la détermination des levures. Lib. Le François, Paris, 1928.
(50) Hjort (A.). — C. R. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol., **25**, 259, 1954.
(51) Ingram (M. A.). — An Introduction to the Biology of Yeasts. Pitman and Sons Ltd, London, 1955.
(52) Jorgensen (A.). — Microorganisms and fermentation. Londres, p. 243, 1900.
(53) Kayser (E.). — *Revue de Vitic.*, **45**, 149, 1916.
(54) Kirsop (B. H.). — *Journ. Inst. Brewing*, **51**, 210, 1954.
(55) Krimbas (B. D.) et Davides (V. X.). — *VI^e Congrès Intern. de la Vigne et du Vin*, Athènes, 1950.
(56) Lafon (M.) . — Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique. Thèse Sciences Phys. Bordeaux, 1955. — *Ann. Technologie agric.*, **4**, 169 et 241, 1955. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956.
(57) Lafourcade (S.). — Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin. Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux, 1955. *Ann. Technologie agric.*, **4**, 283, 1954, *Ind. agric. alim.*, **71**, 15, 1954.
(58) Lindegren (C. C.) et Palleroni (N. J.). — *Nature, G. B.*, **169**, 878, 1952.
(59) Lindegren (C. C.) et Pittmann. — *Journ. gen. Microb.*, G. B., **9**, 494, 1953.
(60) Lodder (J.). — Die anaskosporogenen Hefen. I Hälfte. Amsterdam, 1934.
(61) Lodder (J.) et Kreger-Van Rij (N. J. W.). — The Yeasts. North Holland publishing Company, Amsterdam, 1952.
(62) Lodder (J.) et Kreger-Van Rij (N. J. W.). — Laboratory Practice, **3**, 483, 1954, et **4**, 20 et 53, 1955.
(63) Lund (A.). — Studies on the Ecology of Yeasts. Munksgaard Copenhagen, 1954.
(64) Malan (C. E.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **3**, 338, 1951.
(65) Marques Gomes (J. V.). — *Anais Inst. Vinho Porto*, **10**, 51, 1949.
(66) Marteau (G.) et Galzy (P.). — *Progrès agric. et vitic.*, **142**, 53, 1954.
(67) Martinaud (V.). — *Revue de Vitic.*, **32**, 174, 1909.
(68) Moreau (L.) et Vinet (E.). — *Ann. des ferm.*, **1**, 101, 1935-36.
(69) Morris (E. O.). — *Journ. Applied. Bact.*, **18**, 126, 1955.
(70) Morris (E. O.) et Kirsop (B.). — *Journ. Inst. Brewing*, **59**, 486, 1953.
(71) Mrak (E. M.) et McClung (L. S.). — *Journ. of Bacteriology*, **40**, 395, 1940.
(72) Mrak (E. M.) et Phaff (H. J.). — *Yeasts. Annual Review of Microb.*, 1948.
(73) Muller-Thurgau (H.). — *Zentralblatt. für Bakt.*, n° 20, 1899.
(74) Musso (L.). — Contribution à l'étude des levures algériennes. Thèse Sciences, Paris, 1913.
(75) Musso (L.). — Les levures sélectionnées de vinification. Institut Pasteur d'Algérie, Alger 1932.
(76) Niehaus (J. G.). — *Zentralblatt. für Bakt.*, **87**, 97, 1932.

(77) Nitescu (M. 'A.). — Contribution à l'étude des levures roumaines. Thèse Sciences, Paris, 1915.
(78) Pasteur (L.). — Etudes sur la bière. (Œuvres de Pasteur, t. 5), 1876.
(79) Peynaud (E.) et Domercq (S.). — *Ann. Technologie agric.*, **4**, 265, 1953.
(80) Peynaud (E.) et Domercq (S.). — X^e Congrès Intern. Ind. agric. alim., Madrid, 1954.
(81) Peynaud (E.) et Domercq (S.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **89**, 346, 1955.
(82) Peynaud (E.) et Domercq (S.). — *C. R. Acad. agric.*, **41**, 103, 1955.
(83) Peynaud (E.) et Domercq (S.). — *Archiv. für Mikrob.*, 1956.
(84) Rankine (B. C.). — *Austr. Journ. Applied Science*, **5**, 298, 1954.
(85) Rankine (B. C.). — *Austr. Brew. Wine Journ. in Bull. Intern. Vin*, n° 281, 70, 1954. *Austr. Journ. Applied Science*, **6**, 408, 1955.
(86) Renaud (J.). — Les levures des vins du Val de Loire. Recherches morphologiques, biologiques et cytologiques. Thèse Sciences naturelles, Paris, 1941.
(87) Renaud (J.). — Biologie du Vin. Presses Universitaires de France, Paris.
(88) Rommier (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, **98**, 1594, 1884.
(89) Rosenstiel (A.). — *Revue vit.*, **11**, 509, 1899.
(90) Rossi (G. de). — *Staz. Sperim. agrar. ital.*, **50**, 529, 1917.
(91) Rossi (G. de). — *Staz. Sperim. agrar. ital.*, **53**, 233, 1920.
(92) Rossi (G. de). — IV^e Congrès Intern. Vigne et Vin, Lausanne 1935, in *Bull. intern, Vin*, **91**, 133, 1935.
(93) Rossi (J.). — *Ann. Facolta di Agraria*, Perugia, **9**, 1953.
(94) Rotini (O. T.). — *Ann. Facolta di Agraria*, Perugia, **13**, 1952.
(95) Roy-Chevrier. — *Revue Vitic.*, **11**, 85, 1899.
(96) Saller (W.). — *Wein und Rebe*, n° 27, 540, et n° 28, 562, 1954.
(97) Scardovi (V.). — IX^e Congrès Intern. Ind. agr., Rome, 1952.
(98) Schanderl (H.) et Draczynski (M.). — *Wein und Rebe*, n° 20, 462, 1952.
(99) Scheffer (W. R.) et Mrak (E. M.). — *Mycopathologia mycologia applicata*, **5**, 236, 1951.
(100) Schulle (H.). — *Archiv. für. Mikrobiol.*, **18**, 133, 1953.
(101) Schulle (H.). — *Archiv. für. Mikrobiol.*, **18**, 342, 1953.
(102) Schulle (H.). — *Wein und Rebe*, **36**, 736, 1954.
(103) Skinner (C. E.) et Bouthilet (R.). — *Journ. Bact.*, **53**, 37, 1947.
(104) Soos (I.) et Asvany (A.). — *Ann. Inst. Rech. Ampelogr*, Budapest, **10**, 255, 1950.
(105) Steinberg (B.). — *Trav. Chim. Alim. Hygien.*, **43**, 219, 1952.
(106) Steinberg (B.). — Les levures actives des vins flétris du Domaine de Diolly, Thèse Sciences, Genève, 1953.
(107) Stelling-Dekker (N. M.). — Die Sporogenen Hefen., Amsterdam, 1931.
(108) Tabachnik (J.) et Joslyn (M. A.). — *Journ. Bact.*, **65**, I, 1953 ; *Plant. Physiology*, **28**, 681, 1953.
(109) Tarantola (C.). — *Boll. Soc. Intern. Microbiologia*, **5**, 345, 1933.
(110) Tarantola (C.). — *Ann. Accad. Agric.* Torino, **80**, 1945-1946.
(111) Van Uden et Assis-Lopez. — *Archiv. für Mikrob.*, **19**, 262, 1953.
(112) Ventre (J.). — *Revue Vitic.*, **80**, 181, 1934.
(113) Verona (O.). — *Ann. Facolta di Agraria*, Pisa, **8**, 27, 1947.
(114) Verona (O.). — *Atti. Accad. Georgofili*, 1947.
(115) Verona (O.). — *Ann. Facolta di Agraria*, Pisa, **12**, 123, 1951.
(116) Verona (O.). — *Atti. Accad. ital. vite vino*, **3**, 203, 1951.
(117) Verona (O.). — *Ann. Inst. Pasteur*, **82**, 245, 1952.
(118) Verona (O.) et Florenzano (G.). — *L'Agricoltura italiana*, **47**, 113, 1947.
(119) Verona (O.) et Florenzano (G.). — *Rendiconti dell'Accad. Lincei*, **3**, 383, 1947.
(120) Verona (O.) et Florenzano (G.). — *Ricerca Scient. e ricostruzione*, **17**, n° 9, 1947.

(121) Verona (O.) et Florenzano (G.). — *Ann. Facolta di Agraria*, Pisa, **8**, 1947.
(122) Walt (J. P. Van der). — On the Yeast Candida pulcherrima and its pigment. Thèse, Delft, 1952.
(123) Wickerham (L. J.). — *Journ. Bact.*, **46**, 501, 1943.
(124) Wickerham (L. J.). — Taxonomy of Yeasts, *Technical Bull.*, nº 1029, U. S. Dept. of Agric, Washington, 1951.
(125) Wickerham (L. J.) et Burton (K. A.). — *Journ. Bact.*, **56**, 363, 1948.
(126) Yokotsuka (I.). — Studies on Japanese Wine Yeasts, Research Inst. of Fermentation, Yamanashi, 1954.
(127) Yokotsuka (I.) et Goto (S.). — *Journ. Agric. Chem. Soc. Jap.*, **29**, 39 et 123, 1955.
(128) Zimmermann (J.). — in *Revue Vitic.*, **90**, 472, 1939.

TABLE DES MATIÈRES

Introduction.

Chapitre Premier

HISTORIQUE

Chapitre II

MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ISOLEMENT ET DE CLASSIFICATION

I. — Technique des prélèvements 23
II. — Technique des isolements 25
III. — Etude des levures isolées 27
A. — Examen des caractères morphologiques 28
B. — Examen des caractères physiologiques 30

Chapitre III

DESCRIPTION DES ESPÈCES DE LEVURES ISOLÉES

I. — Levures sporogènes 38
Genre Saccharomyces 38
Genre Saccharomycodes 50
Genre Torulaspora 52
Genres Hansenula et Pichia 54
Genre Debaryomyces 56
II. — Levures non sporogènes 57

Chapitre IV

LEVURES DES RÉGIONS DE VINS ROUGES

I. — Région du Médoc 65
II. — Régions du Libournais, des Graves et des Premières Côtes. .. 70

Chapitre V

LEVURES DES RÉGIONS DE VINS BLANCS

I. — Régions de raisins blancs non pourris..... 78
II. — Levures des régions de pourriture noble..... 81

Chapitre VI

RÉCAPITULATION DES LEVURES DE VINIFICATION

Chapitre VII

LEVURES ISOLÉES DE VINS

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

BIBLIOGRAPHIE

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

PRÉPARATION DES ISOMÈRES ACTIFS PAR DÉDOUBLEMENT DES RACÉMIQUES

Vu et approuvé :
Bordeaux, le 12 mai 1956
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
G. BRUS

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 17 mai 1956
Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
E. DELAGE

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 19-6-1957

Dépôt légal: 2e trimestre 1957 *N° d'impression: 487*